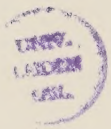
Inhaltsstoffe von Galbanum-Harz

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Mihai Alexa
aus
Merisani-Arges/Rumänien

1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547613_0003

INHALTSSTOFFE VON GALBANUM-HARZ

DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS

DER NATURWISSENSCHAFTEN

DER FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE

DER

EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT

ZU TÜBINGEN

VORGELEGT VON

MIHAI ALEXA

Tag der mündlichen Prüfung:	30. Januar 1984
Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Graf
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. J. Roth

Meinem Onkel
Prof. Dr. Gheorghe Alexa
zu seinem 92. Geburtstag!

Meinem verehrten Gymnasiallehrer
Gheorghe Gîlcă
In memoriam

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Engelbert G r a f am Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen ausgeführt.

Meinem Doktorvater
danke ich herzlich für seine hilfsreiche Unterstützung, sowie für die mir entgegengebrachte Großzügigkeit.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Vorbemerkung		V
I.1	Galbanum-Harz	1
I.2	Geschichte	1
I.3	Vorkommen und Stammpflanzen	1
I.4	Herkunft	2
I.5	Aussehen	2
I.6	Geruch	2
I.7	Wirkung und Verwendung	2
I.8	Inhaltsstoffe	3
I.9	Galbanumöl	3
I.10	Zusammensetzung	3
I.11	Literatur	5
II.1	Bisherige Arbeiten über das Galbanum-Harz	7
II.2	Literatur	9
III.1	Chromatographische Untersuchungen	10
III.2	Dünnschicht-Chromatographie von farblosen Verbindungen aus Galbanum-Harz	13
III.3	Zusammenfassung	15
III.4	Literatur	16
IV.1	Analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie für Galbanum-Harz	17
IV.2	Untersuchungsmethode für Galbanum-Harz	19
IV.3	Analytische HPLC-Experimentell	19
IV.4	Qualitative und quantitative HPLC-Untersuchungen	20
IV.5	Kopplung DC-HPLC Untersuchung des Säureeinflusses und der Temperatur auf rein gewonnene Substanzen aus Galbanum	21

Seite

IV.6	HPLC-Untersuchungen des Temperatureinflusses auf Extrakte des Galbanum-Harzes	22
IV.6.1	HPLC der Destillate	22
IV.7	HPLC von reinen Komponenten aus Galbanum-Harz und der Temperatureinfluß	23
IV.8	Quantitative Auswertung einer HPLC-Trennung von Galbanum-Harz	23
IV.9	Zusammenfassung	24
IV.10	Literatur	38
V.1	Über Guajazulen aus Galbanum-Harz	39
V.2	Über Azulenogene aus Galbanum-Harz	40
V.3	Zur Bildung des Guajazulen bei der Destillation des Galbanum-Harzes	41
V.4	HPLC des Guajazulens	41
V.5	Zusammenfassung	44
V.6	Literatur	45
VI.1	Über Umbelliferon in Galbanum-Harz = Substanz H_2	46
VI.2	Identifizierung von Umbelliferon nach HPLC-Trennung durch DC	46
VI.3	Dünnschichtchromatographische Untersuchungen von Umbelliferon	47
VI.4	HPLC für Umbelliferon aus Galbanum-Harz	47
VI.5	Erstellung der Eichgerade	49
VI.6	Quantitative Auswertung der HPL-Chromatogramme verschiedener Galbanum-Harz-Extrakte	49
VI.7	Zusammenfassung	51
VI.8	Literatur	52
VII.1	Isolierung und Identifizierung bei der Trockendestillation erhaltener Kristalle	53
VII.2	Dünnschicht-Chromatographie der Tiglinsäure	54

		Seite
VII.3	Hochdruckflüssigkeitschromatographie der Tiglinsäure	54
VII.4	Zusammenfassung	55
VIII.1	Isolierung und Identifizierung des Sesquiterpen-umbelliferonethers aus Galbanum-Harz	56
VIII.2	Gewinnung der Sesquiterpen-umbelliferon-ether-Fraktion	56
VIII.3	dc-Analyse der Extrakte	57
VIII.4	Zur Extraktion der Komponenten H_1 bis H_5	59
IX.1	Isolierung und Strukturaufklärung von H_1	60
IX.2	Literatur	72
X.1	Isolierung und Strukturaufklärung von H_3	73
X.2	Literatur	82
XI.1	Isolierung und Strukturaufklärung von H_4	83
XI.2	Literatur	92
XII.1	Isolierung und Strukturaufklärung von H_5	93
XII.2	Literatur	103
XIII.1	Isolierung und Strukturaufklärung von H_7	104
XIII.2	Literatur	111
XIV.1	Isolierung und Strukturaufklärung der Sesquiterpen-ester	112
XV.1	Isolierung und Strukturaufklärung des Sesquiterpenesters S_1	113
XVI.1	Isolierung und Strukturaufklärung von S_2	120

		Seite
XVII.1	Isolierung und Strukturaufklärung von S_3	129
XVIII.1	Isolierung und Strukturaufklärung des Sesquiterpenesters S_4	134
XVIII.2	Literatur	142
XIX.	Zusammenfassung	143

Vorbemerkung

Die aus Galbanum-Harz in dieser Arbeit isolierten und charakterisierten Verbindungen werden wie folgt bezeichnet:

$H_1 = C_{24}H_{32}O_5$
$H_3 = C_{24}H_{28}O_5$
$H_4 = C_{24}H_{30}O_4$
$H_5 = C_{24}H_{30}O_4$
$H_7 = C_{24}H_{28}O_4$
Umbelliferon als H_2

Vier neue Sesquiterpenester vom Guajen-Typ als:

$S_1 = C_{22}H_{34}O_5$
$S_2 = C_{21}H_{34}O_5$
$S_3 = C_{17}H_{26}O_3$
$S_4 = C_{20}H_{32}O_4$

I.1 GALBANUM-Harz

Galbanum; Gummi-resina Galbanum; Mutterharz; Muttergummi; Galbensaft; Galbano.

I.2 Geschichte

Über Galbanum-Harz berichteten:

- Theophrast: Historia plantarum, Lib. IX, cap. 1 und 2;
- Plinii: Naturalis historiae libri, Lib. XII, cap. 25 und 26; Lib. XXIV, cap. 5 und 13;
- Virgilii: Georgika, Lib. III, S. 415 (Disce et odoratam stabulis accedere cedrum, Galbaneoque agitare gravi nidore chelydros);
- Discoridis: Pedacii Dioscoridis, Lib. III, S. 206/207, Editio Johan Bringern, Frankfurt (1610);
- Discoridis: De materia libri, Lib. III, S. 87, Editio Kühn-Sprengel, Vol. I, S. 437 (1829);
- Pharmacopoea Wirtenbergica Stutgardiae S. 110 (1750);
- Vincent: Commerce and Navigation of the Anciente in the Indian Ocean, London, S. 692 (1807).

I.3 Vorkommen und Stammpflanzen

Als Stammpflanze gilt Ferula gummosa BSS (= F. galbaniflua BSS & Busche). Nahe verwandt ist F. badrakeme K.-Pol.. Ferner ist anzunehmen, daß auch andere Ferula-Arten, wie F. schair Borszczov und F. kokanica RGL. & Schmalh als Stammpflanzen in Frage kommen[1].

I.4 Herkunft

Iran, Russ. Turkestan, Westafghanistan, Zentralasien, Pamir-Altai-Gebiet[1].

I.5 Aussehen

Galbanum stellt lose oder zusammenklebende Körner von bräunlicher bis gelber, oft schwach grünlicher Farbe oder eine ziemlich gleichartige, braune, leicht erweichende Masse dar (DAB 6, S. 312).

"Die Handelsware besteht entweder aus schönen, mehr oder weniger regelmäßigen, erbsen- bis walnußgroßen Körnern von gelblich- bis grünlich-brauner Farbe (Galbanum in granis oder lacrimis) oder aus zusammenhängenden Klumpen, in denen neben Stengelfragmenten auch Früchte und andere Verunreinigungen enthalten sind"[2].

I.6 Geruch

Der Geruch ist eigentümlich und widerlich. Der Geschmack ist bitter, aromatisch, an Terpentin erinnernd, würzig, aber nicht scharf.

I.7 Wirkung und Verwendung

Zur Zeit spielt Galbanum in Europa eine sehr untergeordnete Rolle. Gelegentlich wird es noch bei Drüsenschwellungen, Geschwüren, Rheumatismus, Hühneraugen verwendet und Pfla-

stern zugesetzt. Das ätherische Öl wird selten als arzneiliches Reizmittel bei Luftröhrenkatarrh und anderen Erkältungskrankheiten angewandt. Es findet weitere Anwendung in der Homöopathie und in der Parfümerieindustrie.

I.8 Inhaltstoffe

Galbanum wird als 60 %-iges Harz angegeben, das etwa 30 - 40 % Gummisubstanzen und etwa 10 - 22 % ätherische Öle enthält[2].

I.9 Galbanumöl

Destilliertes Galbanumöl wurde schon von Ryff[3], Gesner[4] und Rubeus[5] dargestellt. Man gewinnt das Öl aus dem Gummiharz oder den reifen Früchten durch Wasserdampfdestillation.

I.10 Zusammensetzung

Im Galbanum-Öl wurden nachgewiesen:

d-α-Pinen[7,8,9,22], ß-Pinen[9,12,20], Myrcen[9,12,20], Cadinen[9,10], Cadinol[9,11,12], Nopinen[9], Camphen[9,12,20], Tricyclen[12], cis- und trans-ß-Ocimen, Δ^3-Caren, Limonen, Terpinolen, Linalol, Borneol[12], α-Fenchol[12], Guaiol[12,13,20], α-δ-δ-Eudesmol[12], Bulnesol[12,20], Guajazulen, Isoguajazulen[13], trans-, cis- und trans-n-Undecatrien (1,3,5) und deren Dimerisationsprodukte[14,15,16], Macrolide[17], Pyrazine[18], schwefelhaltige Komponenten[19], 10-epi-Juneol[23,24], cis-Eudesmon[21].

In dem Öl der Früchte von Ferula galbaniflua wurden gefunden:

dl-α- und d-α-Pinen (40 %)[6], d-β-Pinen (30 %), d-Limonen (1,5 %)[6], Essigsäure, Buttersäure, Isovaleriansäure[14].

Die monoterpenischen Fraktionen des Öles betragen 62,7 %[22].

Es wurden α-Pinen (13,8 %), α-Thujen (0,4 %), Camphen (0,1 %), β-Pinen (59 %), Sabinen (Spuren), Δ^3-Caren (19,6 %), α-Phellandren (0,3 %), d-Limonen (4,5 %), β-Phellandren (0,4 %), Terpinolen (1,4 %), Ocimen (Spuren) nachgewiesen[22].

I.11. Literatur

1. Breckle, S. W. und Unger, W., Afganistan Journal, 86, I (1977).
2. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Bd. IV, S. 948. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New-York (1973).
3. Ryff, Gualtherus, New gross Destillierbuch, 1545, fol. 179. Francfurt/M.
4. Philater Euronymus, Pseud. (= C. Gesner), Ein köstlicher theurer Schatz, 1555, S. 237, Tiguri.
5. Rubei, Hieronymi, Liber de destillatione, Basliae, 1581, Cap. 5, S. 148.
6. Rutowski, B. N. und Winogradowa, I. W., J. prakt. Chem. II. 120, 41 (1928).
7. Flückiger, F. A., Pharmakognosie des Pflanzenreiches, 3. Aufl. 1901, S. 65, Berlin.
8. Thoms, H. und Molle, B., Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 11, 90 (1901).
9. Semmler, F. W. und Jonas, K. G., Ber. dtsch. chem. Ges. 47, 2068 (1914).
10. Wallach, O., Liebigs Ann. Chem. 238, 81 (1887).
11. Ruzicka, L. und Stoll, M., Helv. Chim. Acta. 7, 94 (1924).
12. Teisseire, P., Recherche 14, 81 (1964).
13. Wichtl, M., Planta med. (Stgt.) 11, 53 (1963).
14. Naves, Y.-R., Bull. Soc. chim. France 9, 3152 (1967).
15. Chretien-Bessiere, Y., Garnero, J., Benezet, L. und Peyron, L., Bull. Soc. chim. France 1967, 97.
16. Teisseire, P., Corbier, B. und Platier, M., Recherches 1967, 5.
17. Kaiser, R. und Lamparsky, D., Helv. Chim. Acta 61, 1978.
18. Bramwell, A. F. Burrell, J. W. K. und Riezebos, G., Tetrahedron Letters 37, 3215 (1969).
19. Burrell, J. W. K., Lucas, R. A., Michalkiewicz, D. M. und Riezebos, G., Tetrahedron Letters 30, 2837 (1971).

20. Pesnelle, P., Teisseire, P. und Wichtl, M., Planta med. 12, 403 (1964).
21. Thomas, A. F., Ozainne, M., Decorzant, R., Näf, F. und Lukacs, G., Tetrahedron 32, 2261 (1967).
22. Ikeda, R. M., Stanley, Wm. L., Vannier, S. H., Spitler, E. H. und Food, J., Science 27, 455 (1962).

II.1 Bisherige Arbeiten über das Galbanum-Harz

"Das wichtigste Ergebnis der älteren Arbeiten ist die Feststellung, daß bei der trockenen Destillation[1] und der Säurenspaltung[2] des Harzes Umbelliferon entsteht", schrieben 1936 Kunz und Wöldicke[3].

Bevor Mößmer (1861) eine ausführliche Arbeit über Galbanum-Harz veröffentlichte, waren einige oberflächliche Untersuchungen von Walther[4], Neumann[5], Fiddichow[6] und Meissner[7] ausgeführt worden.

Für das bei trockener Destillation des Galbanum-Harzes übergehende Öl wurde von Mößmer die Formel $C_{20}H_{30}O$ und von Kachler[8] $(C_{10}H_{16}O)_n$ angegeben.

Semmler und Jonas[9] haben ebenfalls die Zusammensetzung $C_{10}H_{16}O$ nachgewiesen. Für die bei 240/250° C (760 mm Hg) siedende Fraktion gab auch Kachler[8] die Zusammensetzung $(C_{10}H_{16})_n$ an. Die nächst folgenden Arbeiten untersuchten das Galbanum-Öl, wobei die Fraktionierung ausschließlich durch Destillation erfolgte und die Temperatur fast immer über 100° C lag. Das aber ist bei so labilen Substanzen mit terpenischen und sesquiterpenischen Strukturen nicht ohne Folgen. So sind z. B. die erhaltenen Azulene, die bei der Trockendestillation von Wichtl[10] als Guajazulen und (wahrscheinlich) Isoguajazulen identifiziert wurden, in Galbanum-Harz nicht enthalten, sondern sie entstehen durch Umwandlung oder Zersetzung. Bzgl. der kristallisierten Harzkörper aus Galbanum-Harz waren außer den Neutralkörper I,II[11] und "Galbaresensäure" genannten Verbindungen bisher keine bekannt. Für die Neutralkörper I und II ist eine gleiche Zusammensetzung angegeben, die entweder $C_{24}H_{28}O_4$ oder $C_{23}H_{28}O_4$ sein sollte. Eine endgültige Ent-

scheidung wurde nicht getroffen. Das gleiche gilt auch für die "Galbaresensäure", wo eine Zusammensetzung $C_{23}H_{28}O_5$ und $C_{24}H_{30}O_5$ vorgeschlagen wurde, jedoch auch ohne endgültige Aussage.

II.2 Literatur

1. Sommer, C., Arch. Pharm. 98, 1 (1859).
2. Mößmer, P., Ann. Chem. Pharm. 119, 257 (1861).
3. Kunz, K. und Wöldicke, E., Ber. dtsch. chem. Ges. 2, 359 (1937).
4. Walther, A. F., De Oleis vegetabilium essentialibus, Lipsiae, 1745.
5. Neumann, K., Chymia medica dogmatico-experimentalis, Kassel, 1749, 422.
6. Fiddichow, A., Berliner Jahrbuch der Pharmazie 1816, 230.
7. Meissner, P., Trommsdorffs Neues Journal d. Pharm. (1), 1, 3 (1817).
8. Kachler, H., Ber. dtsch. chem. Ges. 4, 36 (1871).
9. Semmler, F. W., Jonas, K. G., Ber. dtsch. chem. Ges. 47, 2068 (1964).
10. Wichtl, M., Planta med. 11, 53 (1963).
11. Caglioti, L., Naef, H., Arigoni, D. und Jeger, O., Helv. Chim. Acta 41, 2278 (1958).

III. Chromatographische Untersuchungen

III.1 Untersuchungsmaterial

Zur Verfügung stand ein in einem persischen Bazar gekauftes Harz, für dessen Beschaffung Herrn Prof. Dr. Dr. Karl Hummel herzlich gedankt sei. Das Harz wird im Persischen als Ghasni[1)] bezeichnet; Ort und Art der Gewinnung waren nicht zu eruieren. Es wird in Persien als Heilmittel vornehmlich bei Erkrankungen von Galle, Leber und Verdauungstrakt gehandelt.

Neuere Methoden zur Identifizierung der Inhaltsstoffe des Galbanum-Harzes waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit in der Literatur[4-16] nicht bekannt, ausgenommen die Dünnschicht-Chromatographie auf mit $AgNO_3$ imprägnierten Kieselgel G (nach Stahl), um das "Galbanol" in Guajol, Bulnesol, γ-Eudesmol und α und ß-Eudesmol aufzutrennen[2,3] (Sichtbarmachung mit H_2SO_4). Im Verlauf unserer dünnschichtchromatographischen Untersuchungen von Galbanum-Harz ergaben sich drei Systeme als mobile Phase zur Auftrennung der überwiegenden Zahl der Inhaltsstoffe. Die Umbelliferon-Sesquiterpenether lassen sich gut auftrennen unter folgenden Bedingungen:

I. Standardmethode: relative Luftfeuchtigkeit 50 %
Temperatur 20° C

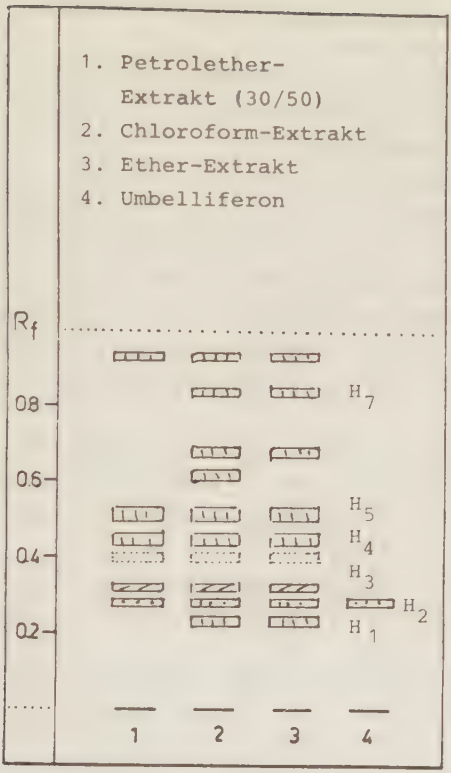
II. Stationäre Phase: Kieselgel Merck Fertigplatten GF_{254}

III. Fließmittel: Chloroform/Methanol (98 + 2)
Toluol/Chloroform/Methanol (70 + 20 + 10); KS.

IV. Nachweis: UV-Licht bei 365 nm, hellblaue Fluoreszenz

V. Untersuchungslösung: Von der gemahlenen Droge wird eine 5 % methanolische Lösung hergestellt und davon jeweils 5 µl auf einen 1 cm langen Streifen aufgetragen. (Abb. 1 und 2)

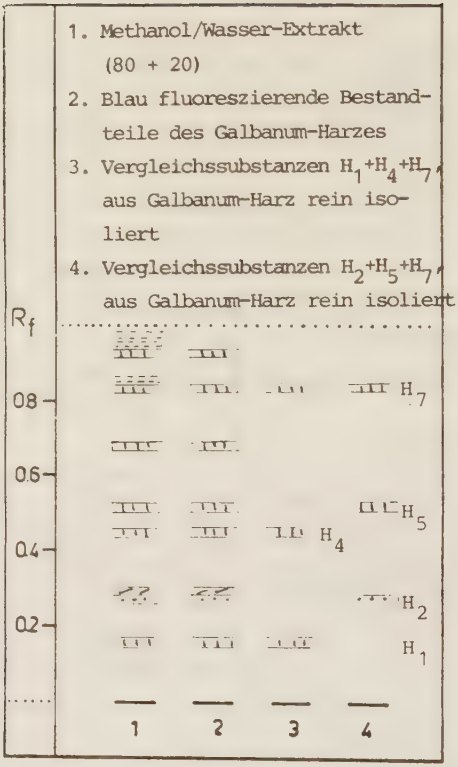
VI. Referenzlösung: 5 mg Umbelliferon in 5 ml Methanol/Chloroform (1 + 1) gelöst. Auftragsmenge 5 µl.



blau bis dunkelblaue Fluoreszenz
hell grün-blaue Fl.
schwach blaue Fl.
dunkelblaue Fl.

Abb. 1: Chromatogramm-Schema der Galbanum-Harz-Extrakte in UV-Licht (365 nm)

Das DC wurde in Toluol/Methanol/Chloroform (70 + 10 + 20) entwickelt und sollte hauptsächlich der Identifizierung von Substanzen, die in kurzwelligem UV-Licht fluoreszieren (ohne Besprühen), dienen.



im UV-Licht nicht Fl. Bestandteile

Abb. 2: Chromatogramm-Schema der Galbanum-Harz-Extrakte im UV-Licht 365 und 254 mn

Das DC wurde in Chloroform/Methanol (98 + 2) entwickelt und sollte der Identifizierung von Bestandteilen des Galbanum-Harzes, die in lang- oder kurzwelligem UV-Licht absorbieren bzw. fluoreszieren (ohne Besprühen) dienen.

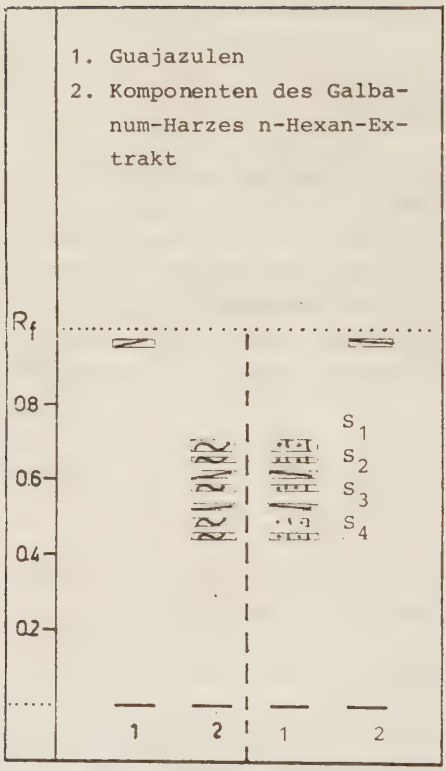
III.2 Dünnschicht-Chromatographie von farblosen Verbindungen aus Galbanum-Harz

Um die farblosen Verbindungen, die keine Eigenabsorption im kurzwelligen UV-Bereich (254 nm) haben und auch nicht durch das langwellige UV-Licht (365 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden können, auf dem Chromatogramm sichtbar zu machen (auf Grund einer chemischen Reaktion), wurde Aufsprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure, die für die Terpenderivate und Naturstoffe geeignet ist, vorgenommen.

Nach Aufsprühen von etwa 10 ml Reagenz und 10 Min. langem Erhitzen der DC-Platte auf 110-120° C folgte die Auswertung im Tages- und UV-Licht (365 nm), Abb. 3.

Eine klare und deutliche Trennung der farblosen Verbindungen erfolgt unter folgenden Bedingungen:

- Standardmethode: relative Luftfeuchtigkeit 50 %, Temp. 20° C;
- Schicht (stationäre Phase): Kieselgel GF_{254} Merck Fertigplatten;
- Fließmittel (mobile Phase) KS: n-Hexan/Ethylacetat 70 + 30 und Chloroform/Methanol (98 + 2);
- Nachweis: Anisaldehyd-Schwefelsäure, 10 Min. auf 110° C erhitzen, im Tages- und UV-Licht (365 nm) betrachten;
- Untersuchungslösung:
  Extrakt: von der gemahlenen Droge wurden 5 proz. n-Hexan- und Diethylether-Auszüge hergestellt und davon jeweils 20 µl auf einen 1 cm langen Streifen aufgetragen;
- Referenzlösung: 5 mg Guajazulen in 5 ml Methanol gelöst;
- Auftragmenge: 5 µl.



Im Tageslicht

rötlich violett

Im UV-Licht (365 mn)

rötliche Fl. grün-helle Fl.

Abb. 3: Chromatogramm-Schema von Galbanum-Harz n-Hexan-Extrakt.

Das DC Abb. 3 wurde in n-Hexan/Ethylacetat (70 + 30) entwickelt und sollte hauptsächlich der Identifizierung von Substanzen dienen, die nach Besprühung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure und 5 Min. bei 105° C erhitzt, in kurzwelligem UV-Licht gelbgrün fluoreszieren und bei Tageslicht violette Färbung aufweisen.

III.3 Zusammenfassung

- Es wurden zwei DC-Systeme zur Trennung und Identifizierung der Sesquiterpen-umbelliferonether entwickelt, die gleichzeitig auch für PC und SC geeignet sind.
- Weiterhin wurde ein DC-System zum Nachweis jener Bestandteile des Galbanum-Harzes entwickelt, die im UV-Bereich (254 bzw. 365 nm) keine Absorption zeigen. Das läßt sich auch auf SC und PC übertragen.

III.4 Literatur

1. Schlimmer, J. L., Terminologie Medico-Pharmaceutique et Antropologique, Teheran 1874, S. 295; Ed. Ali Gouli khan.
2. Wichtl, M., Planta med. 11, 53 (1963).
3. Stahl, E., Dünnschicht-Chromatographie, Zweite Aufl., Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1967, S. 203-253.
4. Barrett, C. B., Dalla, M. S. J., und Padley, F. B., Chem. Ind. 1962, 1050.
5. Frauendorf, H. u. Auterhoff, H.: Dtsch. Apoth.-Ztg. 103, 1299 (1963).
6. Jork, H.: Dtsch. Apoth.-Ztg. 102, 1263 (1962).
7. Masse, J. u. Paris, R.: Ann. pharm. franc. 22, 349 (1964).
8. Mills, J. S. u. Werner, A. E.: Nature (Lond.) 169, 1064 (1952).
9. Noller, C. R., Melera, A. u. Gut, M.: Tetrahedron Letters 15 (1960).
10. Rothenheimer, C.: Pharm. Ztg. 74, 712 (1929).
11. Moreira, E. A. u. Cecy, C.: Trib. Farm. 32, 55 (1964).
12. Norin, T. u. Westfelt, L.: Acta. chem. scand. 17, 1828 (1963).
13. Stahl, E., Pharm. Rdsch. 1, Heft 2, 1 (1959).
14. Stock, E.: Analyse der Harze, Balsame und Gummiharze, 2. Aufl. Berlin: Springer, 1930.
15. Zinkel, D. F. u. Rowe, J. W.: J. Chromatog. 13, 74 (1964).
16. Stahl, E., Chromatographische und mikroskopische Analyse von Drogen, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York 1978.

IV.1 Analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie für Galbanum-Harz

HPLC ermöglicht die Trennung und die Bestimmung (gleichzeitig DC, UV, ^{1}H-NMR und MS eingesetzt) von organischen Verbindungen. Die Auftrennung von Naturstoffen ist wegen einer breiten Polaritätsskala der einzelnen Bestandteile erschwert. Beim Auffinden eines geeigneten Trennsystems im Bereich der Pharmazeutik, Biochemie etc., wo Bodenzahlen über 50000 erforderlich sind, ist die Erfahrung der Forscher entscheidend. Mathematisierte Verfahren, die geeignete Trennsysteme errechnen könnten, gibt es nicht. Experimentell ist auch bisher nicht verifiziert, ob die Gauß-Verteilungskurve Voraussetzung für die Auswertung von Elutionsbanden ist. Auch über die Vor- und Nachteile von runden oder gebrochenen Teilchen gibt es keine einstimmige Auffassung.[7] HPLC allein kann nicht über die Reinheit einer Substanz entscheiden. Ein Peak kann mehrere Komponenten mit verschiedenen oder ähnlichen Strukturen verbergen. Damit sich unter einem Peak nicht mehrere Substanzen verbergen, muß unbedingt eine Kopplung DC-HPLC oder GC-HPLC durchgeführt werden, um eine an Sicherheit grenzende Aussage treffen zu können.

Für Trennungen der Naturstoffe sind Bodenzahlen über 50000 häufig erforderlich, wobei Kapillar-GC nicht anwendbar ist und somit nur die Kopplung DC-HPLC aussagekräftig ist. Kopplungen HPLC-MS können vorgenommen werden, wenn vorher bewiesen wurde, daß der Peak nur von einer Substanz herrührt. In der Praxis zeigt ein Vergleich DC-HPLC eines Extraktes, z. B. Aloe*, daß viele der etwa elf Komponenten, die auf dem DC erschienen sind, auf dem HPL-Chromatogramm fehlen (nur 7 Peaks). Die Fragestellung ist nicht, warum für diese im DC nachweisbaren Komponenten keine entspre-

* Graf, E. und Alexa, M., in Vorbereitung.

chenden Peaks erschienen sind, sondern ob die aufgetretenen Peaks tatsächlich einzelnen Verbindungen zuzuordnen sind. Dies kann bewiesen werden, indem entsprechende, getrennte Komponenten vom DC entnommen, eluiert und HPLC injiziert werden. Damit ist auch eine Charakterisierung des DC möglich und Artefakte sind damit auch ausgeschlossen.

Die Fraktionierung und Gewinnung von Naturstoffen erfolgt häufig unter Einsatz von Alkalien, Säuren, Wasserdampf- und Vacuumdestillationen, was öfter zu Zersetzungs- und Umwandlungsprodukten führt. Es ist bereits bewiesen[1], daß bei (einigen) Naturharzen die Behandlung mit einer minimalen Menge Alkali (wobei das pH nicht als basisch bezeichnet werden kann) zu Umwandlungen oder fast totalen Zersetzungen führt. Auch Lösungsmittel wie Pyridin oder Diethylamin können gleiche Effekte haben[2].

Enthält ein Bestandteil der untersuchten Droge einen ß-Gluco-pyranosering, so ist es möglich, in protoniertem Milieu und mit Aceton als Lösungsmittel Ketale herzustellen[3].

Eine Kopplung DC-HPLC hilft - falls Artefakte entstehen - zu beweisen, daß die isolierte Substanz dem Bestandteil der untersuchten Droge entspricht.

Da Galbanum-Harz etherische Öle und Sesquiterpen-umbelliferonether enthält, die unzersetzt kaum verdampfbar sind, und die konventionellen Methoden, auch GC auf gepackten Säulen, keine befriedigende quantitative und qualitative Bestimmungen ermöglichen, ist die HPLC-DC Kopplung die geeignete Untersuchungsmethode.

IV.2 Untersuchungsmethode für Galbanum-Harz

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit konnten wir uns nicht auf in der Literatur angegebene Trennsysteme oder HPLC-Trennparameter für unser Problem stützen.

Es waren durch HPLC wenige Naturstoffgemische und keine Naturharze getrennt worden. Auch zur präparativen HPLC von Naturharzen lagen keine näheren Untersuchungen vor.

IV. 3 Analytische HPLC experimentell

Geräte: Hochdruckflüssigkeitschromatograph Knauer FR 30
und Liquid Chromatograph Hupe + Busch 1010
Hewlett-Packard

Säule: Knauer Stahlsäule (250 x 4,6 mm), gefüllt mit Li-Chrosorb^{R} RP-8 und RP-18, Korngröße 7- bzw. 5 µm

Durchflußrate: 1 bis 1,5 ml/min

Detektion: UV-Teil des Dual-Detektors DB Pa 6100 bzw. 1030 E
Variable Wavelength UV Detektor Hewlett-Packard

Fließmittel: Methanol/Wasser und Acetonitril/Methanol/Wasser

Probelösung: 1 µg/1 µl

Sämtliche Proben wurden vor dem Injizieren auf die Säule durch einen Sartorius-Membranfilter filtriert.

IV. 4 Qualitative und quantitative HPLC-Untersuchungen

Die Sequiterpen-umbelliferonether aus Galbanum-Harz lassen sich gut auf reversed-phase-Säulen von anderen Verbindungen trennen. Qualitative Identifizierung und sogar quantitative Bestimmung sind somit möglich. Besonders vorteilhaft zeigt sich die HPLC bei der Analyse der Inhaltstoffe des Galbanum-Harzes, wobei verschiedene organische Lösungsmittel zur Extraktion verwendet werden. Wird die Extraktion mit polaren oder wenig polaren Lösungsmitteln durchgeführt, so lassen sich entsprechend bedeutende qualitative Unterschiede aufgrund der HPL-Chromatogramme nachweisen, was dünnschichtchromatographisch kaum möglich ist. Qualitativ wurden Extrakte in Petrolether (30/50), Diethylether, Chloroform, Methanol, Methanol:Wasser (4:1) gleichzeitig mit Wasserdampf- und Trockendestillation untersucht.

Trennversuche auf einer reversed-phase-Säule (RP-8) mit wechselnden Konzentrationen an Methanol:Wasser als Eluent erbrachten gute Trennergebnisse. Eine sehr gute Trennung wurde mit der Säule RP-18 und Methanol:Wasser (80:20) als Eluent bei Zimmertemperatur erreicht. Der Nachweis der getrennten Substanzen erfolgte durch DC, MS und UV-Spektren. Gleichzeitig wurde zu diesem Zweck der in Ether oder Chloroform gelöste Galbanum-Harzanteil in verschiedenen Laufmitteln chromatographiert. Die Flecke wurden entweder nur in kurz- oder langwelligem UV-Licht oder nach Besprühen dern einen Plattenhälfte durch Rf-Vergleich markiert, die Zonen der Platte entnommen, die Substanzen mit Methanol aus dem Kieselgel gelöst, eingeengt und in den HPL-Chromatographen injiziert.

Die Ergebnisse der HPLC-Analyse der einzelnen eluierten

Zonen sind in Abb. 4 und 5 zusammengestellt und mit reinen aus Galbanum-Harz gewonnenen Komponenten (Umbelliferonethern) bestätigt.

Die Analyse der HPL-Chromatogramme weist auf die Möglichkeit hin, mehr einer gewünschten Komponente durch selektive Extraktionen zu gewinnen.

Eine Extraktion mit Methanol/Wasser (80/20) führt hauptsächlich zur Gewinnung der Verbindungen H_1, H_3, H_4 und H_5 (Abb. 6). Substanz $H_{4/5}$ wird aus Galbanum-Harz besser mit Chloroform gewonnen (Abb. 7).

Wie das Chromatogramm Abb. 8 zeigt, sind in einem Petrolether-Extrakt die Komponenten H_1, H_2 und H_3 kaum vorhanden, dagegen werden H_1 und H_3 gut mit Diethylether extrahiert, teilweise auch Umbelliferon (H_2).

Verglichen mit einem HPL-Chromatogramm eines Ether-Extraktes (Abb. 9) sind die Verbindungen mit über fünf Minuten Retentionszeit kaum zu sehen, es treten aber neue Peaks wie H_2 (Umbelliferon) und der große Peak H_1 auf.

IV.5 Kopplung DC-HPLC Untersuchung des Säureeinflusses und der Temperatur auf rein gewonnene Substanzen aus Galbanum

Mit Hilfe der HPLC und parallel dazu der DC wurde weiter untersucht, wie einige aus Galbanum-Harz gewonnene Verbindungen - laut DC und HPLC rein - sich bei Behandlung mit Säuren verändern: Die Sesquiterpen-Umbelliferonether H_1, H_3, H_4, H_5 und H_7 spalten bei der Behandlung mit Salz- oder Schwefelsäure Umbelliferon ab, was durch DC, HPLC und MS nachweisbar ist. Abb. 10 zeigt ein HPL-Chromatogramm des H_1

nachdem die Substanz kurz mit konzentrierter Salzsäure in Berührung kam und wieder in Cbloroform aufgenommen wurde. Neben dem Umbelliferon-Peak entstehen eine Reihe Zersetzungsprodukte (DC-Abb. 11).

Diese Zersetzungsprodukte treten aber zugleich als Komponenten des Galbanum-Harzes auf.

Die Kopplung DC-HPLC hilft, diese Feststellung nachzuweisen. Entnommene Zonen von der DC-Platte und HPL-chromatographiert, oder DC-Untersuchungen der getrennt aufgefangenen Peaks ermöglichen den Beweis, daß eine einzige Substanz H_1 ($C_{20}H_{32}O_5$) als Muttersubstanz fast aller im Galbanum-Harz vorhandenen Sesquiterpen-Umbelliferonether anzunehmen ist.

Ob diese Umwandlungen durch enzymatische Prozesse in Ferula galbaniflua oder nur durch äußere Einflüsse entstehen, bleibt nachzuforschen.

Ohne Zweifel kann nachgewiesen werden, daß Erhitzen, Säuren und Alkalien bis zur totalen Zersetzung der Sesquiterpen-Umbelliferonether führen (Abb. 12 - 15 und 16).

IV.6 HPLC-Untersuchungen des Temperatureinflusses auf Extrakte des Galbanum-Harzes

IV.6.1 HPLC der Destillate

Sehr interessante Erkenntnisse werden erreicht bei einem Vergleich zwischen den oben angeführten HPL-Chromatogrammen (Abb. 6 bis 16) der Galbanum-Harz-Extrakte (unter Schutz vor Licht und Wärme hergestellt) und deren Destillation.

Der starke Einfluß der Temperatur ist in dem HPL-Chromatogramm Abb. 14 und 15 sichtbar. Es treten eine Reihe von Zersetzungs- und Umwandlungsprodukten auf, die auch dc nachweisbar sind und nicht als genuine Bestandteile des Galbanum-Harzes einzuordnen sind.

IV.7 HPLC von reinen Komponenten aus Galbanum-Harz und der Temperatureinfluß

Inwiefern sich reine, aus Galbanum-Harz gewonnene Substanzen bei hohen Temperaturen verändern, zeigen die HPL-Chromatogramme Abb. 16.

Die Substanz H_1 wurde in einem offenen Rohr im Zonenschmelzgerät auf 260° C erhitzt.

Es ist ein großer Unterschied, ob reine Substanzen oder die Gesamtextrakte erhitzt werden. Die Wirkung anderer Komponenten auf die reinen Bestandteile des Galbanum-Harzes wird in einem weiteren Kapitel dieser Arbeit beschrieben.

IV.8 Quantitative Auswertung einer HPLC-Trennung von Galbanum-Harz

Die Bestimmungen erfolgen photometrisch unter Benutzung eines externen Standards.

Die gelieferten Signale (Peaks) sind von der Konzentration abhängig. Die Nachweisempfindlichkeit liegt bei der Photometerdetektion bei 10^{-6} bis 10^{-8} (4).

Die Auswertung der Peaks kann manuell oder elektronisch über die Höhe erfolgen.

Die Peakmessungen sind reproduzierbar und genauer als die Flächenintegration (5).

Da kein Integrator zur Verfügung stand, wurden Handauswertungen durchgeführt und die Prozentgehalte P der Inhaltstoffe mit der nachstehenden Formel (6) berechnet.

$$P = \frac{C.P_A \cdot 100}{A.P_V}$$

P=Prozentgehalt der Analysensubstanz am betreffenden Inhaltsstoff
C=Konzentration der Vergleichslösung (mg/ml)
A=Konzentration der Analysensubstanzlösung (mg/ml)
P_A=Peakhöhe der Analysenlösung (mm)
P_V=Peakhöhe der Vergleichslösung (mm)

Bei der Chromatographie müssen für die Vergleichs- und Analysenlösung identische Versuchsbedingungen (Druck, Temperatur, Meßverstärkung) eingehalten werden.

IV.9 Zusammenfassung

-Es wurde ein qualitativ analytisches HPLC-System entwikkelt, um die Hauptbestandteile des Galbanum-Harzes zu identifizieren.
-Mit dem entwickelten HPLC-System ist es möglich, den Einfluß von Temperatur, Säuren oder anderen Faktoren auf die ursprünglichen Komponenten des Galbanum-Harzes nachzuweisen.
-Eine Kopplung DC-HPLC zur Überprüfung der Reinheit aller gewonnenen Komponenten von Galbanum-Harz wurde durchgeführt.

-Das HPLC-System hilft, gezielt einzelne Komponenten durch kombinierte Elutionen zu gewinnen, was mit DC kaum erreichbar ist.

-Es wurde nachgewiesen, daß fast alle im Harz vorhandenen Sesquiterpen-Umbelliferonether sich aus H_1 bilden, je nach dem ob man H_1 erhitzt oder mit Säuren oder mit Laugen behandelt.

-Es wurde ein quantitatives HPLC-Programm mit Eichgeraden oder externem Standard entwickelt, mit dem sich die Hauptbestandteile des Galbanum-Harzes bestimmen lassen.

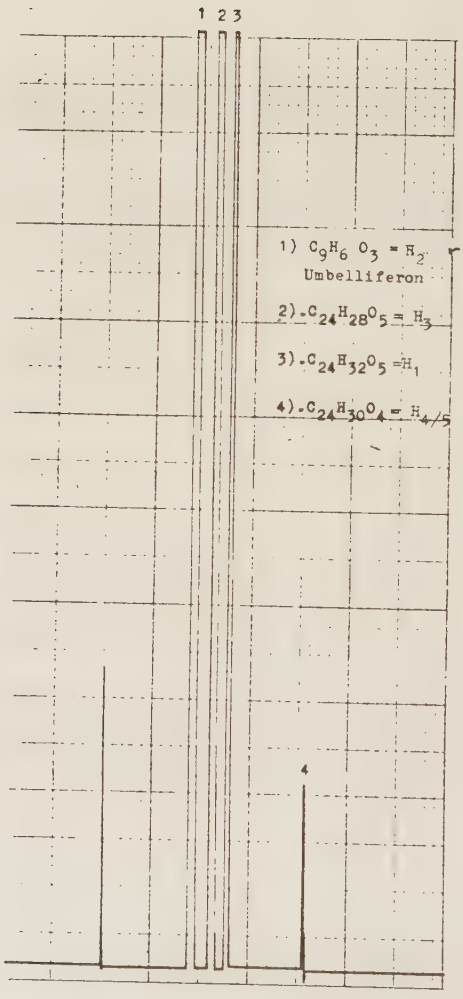


Abb. 4: HPL-Chromatogramm eines Gemisches reiner Substanzen aus Galbanum Harz.
H_1 = Peak 3; H_2 = Peak 1; H_3 = Peak 2; H_4, H_5 = Peak 4.
Säule: RP-18 Lichrosorb^R (7 µm)
Fließmittel: Methanol + Wasser + Acetonitril (0+20+50)
Durchfluß: 1,5 ml/min bei 0,5Inch
Detektion: λ 210 nm
Gerät: Liquid Chromatograph Hupe + Busch 1010 B Hewlett-Packard

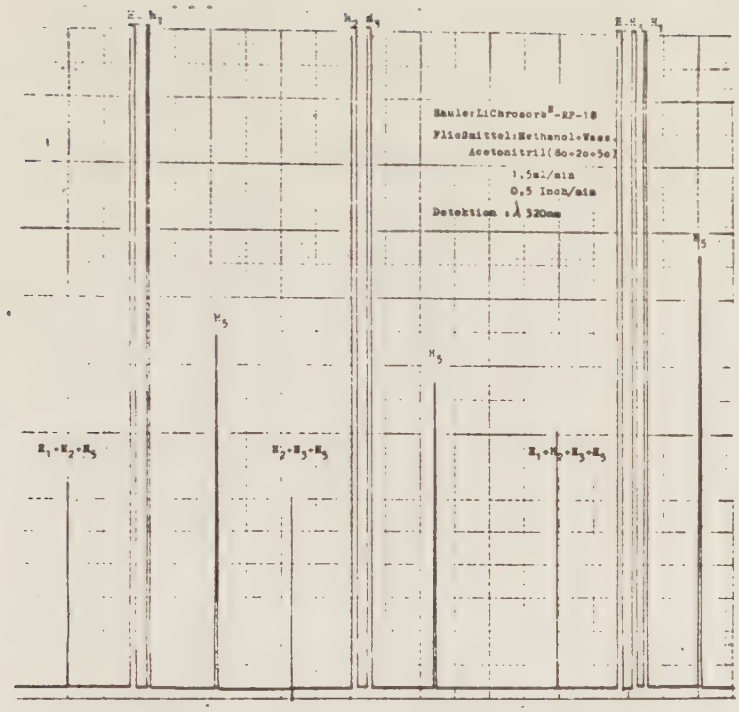


Abb. 5: HPL-Chromatogramm eines Gemisches reiner Bestandteile aus Galbanum-Harz
Detektion: λ - 320 nm.

Die weiteren HPL-Chromatogramme Abb. 6-10; 14-17 wurden mit einem Hochdruckflüssigkeitschromatograph Knauer FR-30, Säule RP-18 LiChrosorb^{R} (240 x 4,6 mm) 7 µm, Fließmittel Methanol/Wasser (80 + 20) 1 ml/min.
Papiergeschwindigkeit 1 cm/min. durchgeführt.

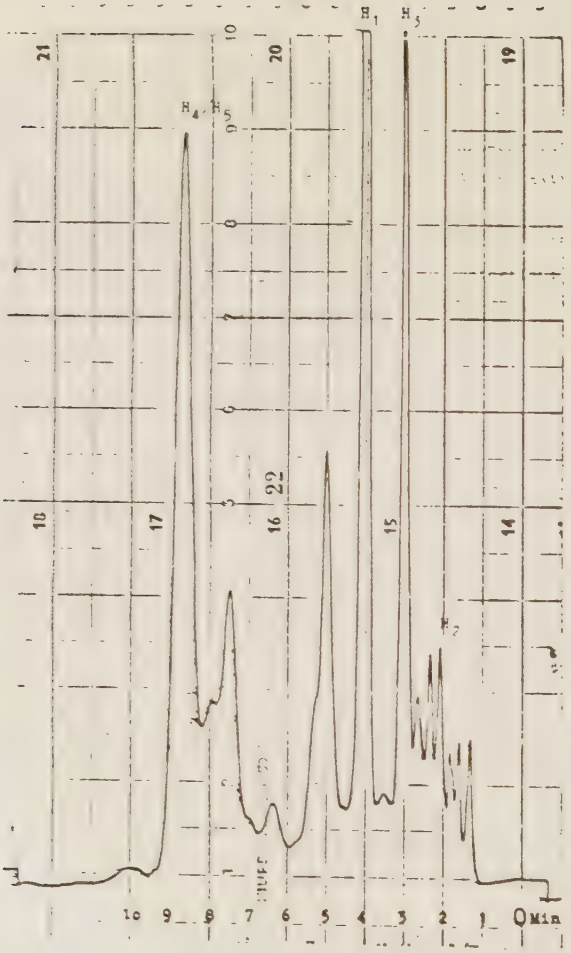


Abb. 6: HPL-Chromatogramm eines Methanol/Wasser Extrakts (80 + 20)
Säule: RP-18 LiChrosorb^{R} (240 x 4,6 mm); 7 µm
Fließmittel: Methanol + Wasser (80 + 20), 1 ml/min.
Detektion: λ -254 nm

Abb. 7: HPL-Chromatogramm des Chloroform Extrakts, mit Petrolether nach Abziehen des Chloroforms gewaschen.

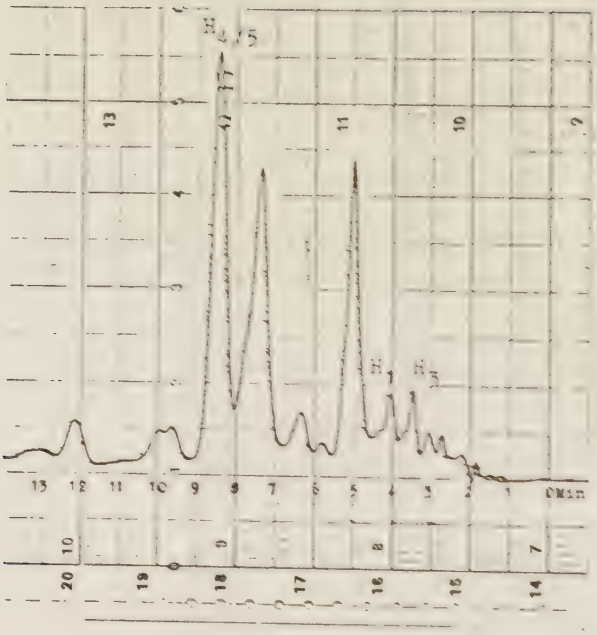


Abb. 8: HPL-Chromatogramm eines Petrolether Extrakts.

Abb. 9: HPL-Chromatogramm eines Diethylether Extrakts.

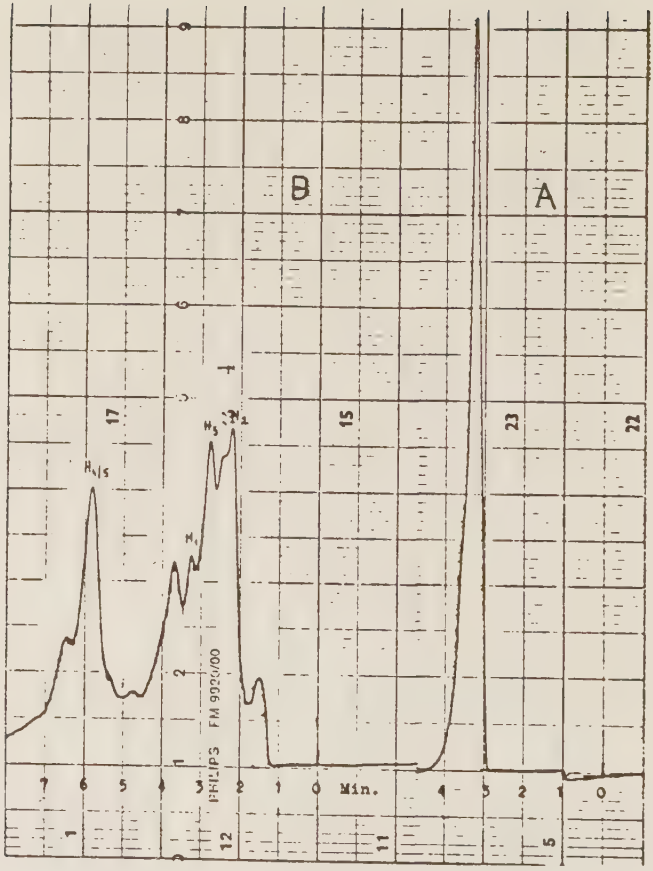


Abb. 10: HPL-Chromatogramm des Sesquiterpen-umbelliferon-ethers H_1 vor (A) und (B) kurzer Behandlung HCl. ($CHCl_3$-Auszug)

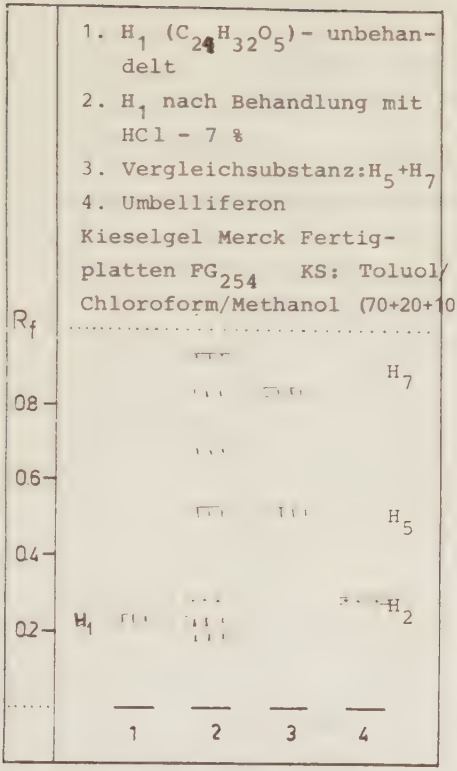
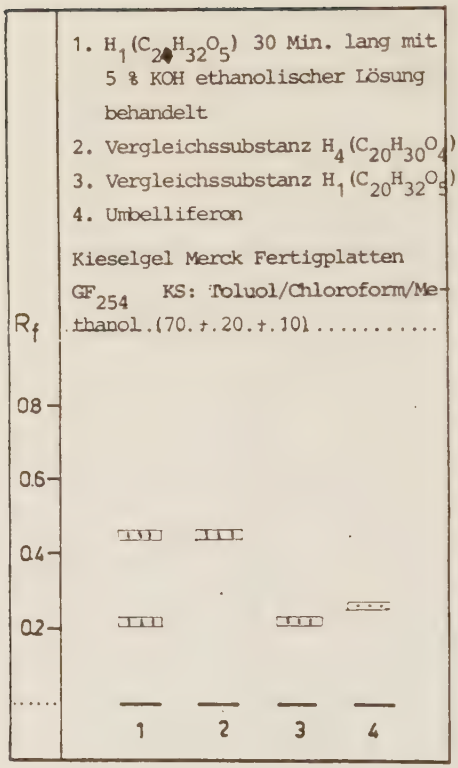
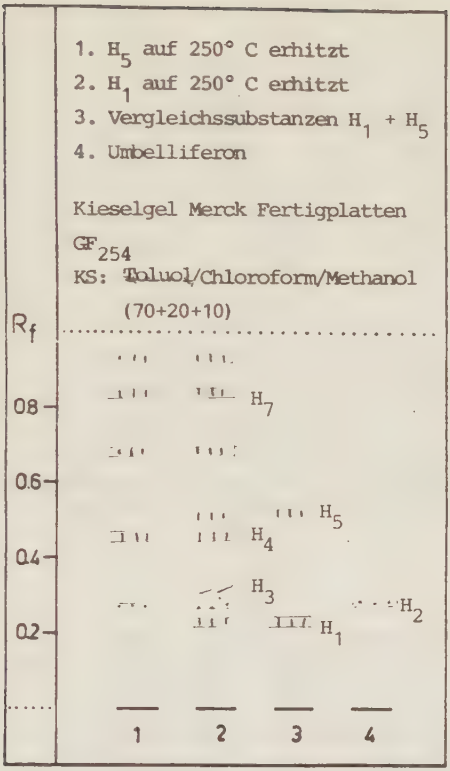


Abb. 11: Chromatogrammschema von H_1 vor und nach kurzer Behandlung mit HCl. Durch diese DC und durch die Kopplung DC/HPLC ist nachzuweisen, daß Komponenten des Galbanum-Harzes durch Säurehydrolyse des H_1 entstehen können.



blaue Fl. grün-blaue Fl.

Abb. 12: Chromatogrammschema von H_1 nach Behandlung mit 5 %-er KOH-äthanolischer Lösung bei Zimmertemperatur.
Es bildet sich H_4, eine im Galbanum-Harz vorhandene Komponente.



blaue Fl. grün- blaue Fl. dunkelblaue Fl.

Abb. 13: Chromatogrammschema von H_1 ($C_{20}H_{32}O_5$) und H_5 ($C_{20}H_{30}O_4$) nach Erhitzen auf 260° C.
Es ist zu beachten, daß fast alle im Harz vorhanden Sesquiterpen-umbelliferonether sich aus H_1 bilden, je nach dem ob man H_1 erhitzt oder mit Säuren behandelt. Die Kopplung HPLC stimmt für diese Aussage überein.

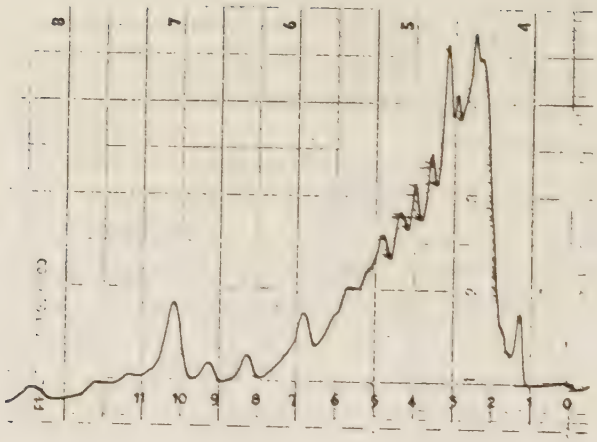


Abb. 14: HPL-Chromatogramm des bei 100° C im Vacuum übergegangenen Destillats, Säule RP-18 (7 µm).

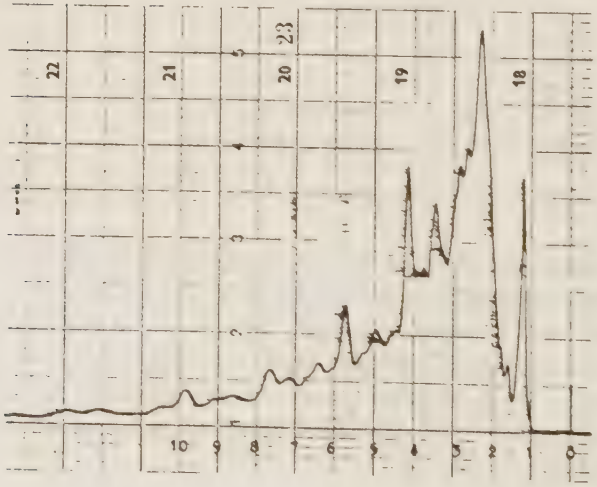


Abb.15: HPL-Chromatogramm des bei 100° C im Vakuum übergegangenen Destillats, Säule RP-8 (7 µm).

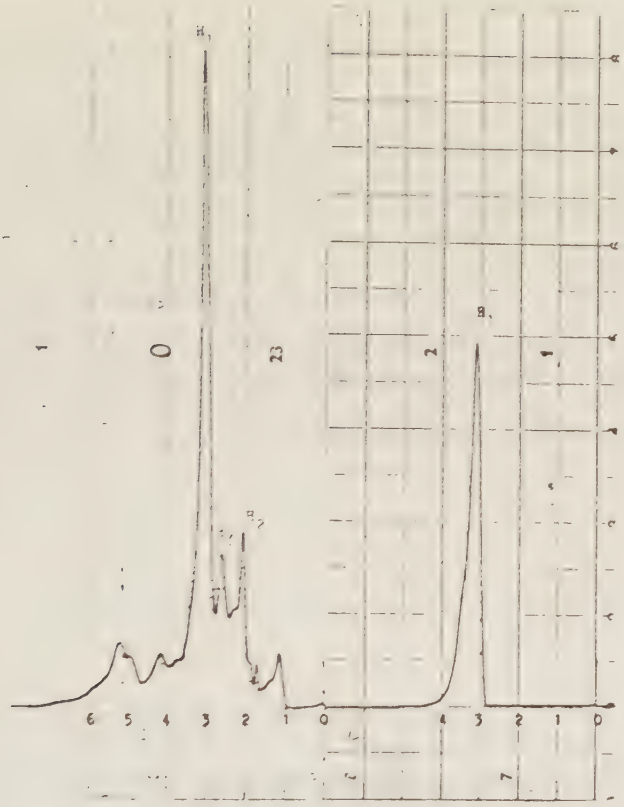


Abb. 16: HPL-Chromatogramm von Substanz H_1 ($C_{24}H_{32}O_5$) vor (A) und nach (B).
Erhitzen (im Vacuum) auf 260° C (Zonenschmelzgerät)

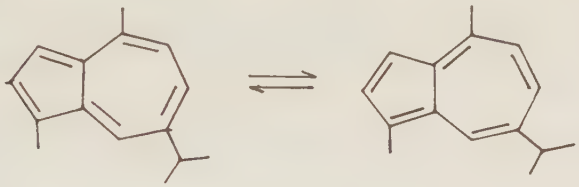
IV.10 Literatur

1. Graf, E. und Alexa, M., Planta med. 38, 121 (1980)
2. Graf, E. und Alexa, M., in Vorbereitung
3. Graf, E., Breitmeier, E. und Alexa, M., Planta med. 40, 197 (1980)
4. Blume, H., Pharmazie heute 2, 67 (1977)
5. Uihlein, M., Kritische Anmerkungen zur quantitativen HPLC, Königsteiner Chromatographie Tage (1976)
6. Graf, E. und Alexa, M., Arch. Pharm. (Weinheim) 313, 285 (1980)
7. Halaz, I. und Görlitz, G., Angew. Chem. 94, 50 (1982)

V.1 Über Guajazulen aus Galbanum-Harz

Bei der trockenen Destillation von Galbanum-Harz wird ein tief gefärbtes Destillat erhalten. Darüber wurde in der Literatur mehrmals berichtet. Im großen Handbuch "Die Harze" von Tschirsch und Storck (1935) wird die Arbeit von Kachler zitiert, der über "ein schön blaues, aromatisch riechendes Öl" (Sdp. 259° C) berichtete.

Wichtl[1] untersuchte das blaue Destillat, isolierte die blauen Farbstoffe und fand, daß ein Gemisch von Guajazulen und "wahrscheinlich" Isoguajazulen vorlag.



Daß Guajazulen ein Zersetzungsprodukt ist, besteht kein Zweifel. Als Azulenogen aus Galbanum-Harz isolierte Wichtl eine Substanz, die sich bei gaschromatographischer Prüfung als einheitlich erwies, nach Sabetay (mit Brom), Stahl (mit p-Dimethylaminobenzaldehyd), Treibs (Joddehydrierung) als Azulenogen reagiert und als Galbanol bezeichnet wurde.

Eine erneute Untersuchung brachte aber den Nachweis, daß Galbanol keine einheitliche Verbindung ist, sondern ein Gemisch von Guajol (10 %), Bulnesol (40 %), Eudesmol (30 %) und ß und ϒ Eudesmol (15 %)[2].

V.2 Über Azulenogene aus Galbanum-Harz

Die von Wichtl beschriebene Substanz "Galbanol" ist nicht genuin. Sie tritt nach Wasserdampfdestillation auf und wird offenbar erst während dieser gebildet.

Im Gegensatz dazu sprechen unsere Ergebnisse für vorhandene Verbindungen, die als Azulenogene zu bezeichnen und in die Klasse der Guajene einzuordnen sind.

Es ist bekannt, daß bei der Dehydrierung eines Pseudoguajanolids Guajazulen entsteht[3]. Gleichzeitig entstehen andere dehydrierte Verbindungen, die alle Kohlenstoffatome enthalten, welche vorher in den Pseudoguajanoliden enthalten waren. Bei dem Prozeß erfolgt Wanderung der Methylgruppe von C - 5 nach C - 4. Die Pseudoguajanolide und die Guajanolide liefern Azulene, wenn sie direkt mit Se, Pd oder S behandelt werden.

Zwei von uns isolierte Substanzen aus Galbanum-Harz, S_2 und S_4 ($C_{21}H_{34}O_5$ bzw. $C_{20}H_{32}O_4$), liefern in Anwesenheit kleiner Mengen Schwefel beim Erhitzen über 160° C Guajazulen (durch DC und HPLC nachgewiesen). Nach der Extraktion von Galbanum-Harz mit konzentrierter Phosphorsäure kann Guajazulen aus der verdünnten Säure mit Petrolether isoliert werden.

Erhitzt man die beiden Verbindungen S_2 und S_4 bis 280° C ohne Schwefel, bildet sich kein Guajazulen. Wird nach dem Erhitzen Schwefel zugegeben und weiter erhitzt, bildet sich keine blaue Färbung.

V.3 Zur Bildung des Guajazulens bei der Destillation des Galbanum-Harzes

Guajazulen entsteht aus Azulenogenen nur in Anwesenheit von Schwefel, Selen oder Palladium[3].

Tatsächlich wurden flüchtige Thioester im Galbanum-Harz nachgewiesen[4]. Die Bildung von Guajazulen bei der Destillation des Galbanum-Harzes findet so lange statt, wie diese Schwefelverbindungen, die als Dehydrierungsreagenz wirken, vorhanden sind. Eine weitere Bildung von Guajazulen ist durch Hinzufügen von Schwefel möglich. Diese Tatsache spricht dafür, daß dort, wo Guajazulen oder Azulene schon bei bloßer Destillation des natürlichen Produktes entstehen, eine natürliche S (Se, Pd)-Verbindung enthalten ist.

V.4 HPLC des Guajazulens

Die Identifizierung von Guajazulen mittels HPLC erfolgt auf einer reversed-phase-Säule RP-8 (240 x 4,6 mm; 7µm), Abb. 17 und 18. Eine quantitative Bestimmung mittels Eichgerader oder externen Standards ist möglich unter Berücksichtigung der unten angegebenen Daten.

Auf der oben angegebenen Säule wurde Guajazulen der Fa. EGA-Chemie als Referenz untersucht. Als mobile Phase diente Methanol/Wasser (50 + 50). Zur Detektion wurde die Absorption bei 254 nm gemessen. Nach etwa neun Minuten erscheint ein etwas breiter Peak. Wenn die Konzentration des Methanols auf 90 % erhöht wird, erscheinen neben anderen Peaks zwei scharfe Hauptpeaks im Mengenverhältnis 55:45. Das gleiche gilt, wenn statt Methanol/Wasser als mobile Phase Acetonitril/Wasser (90 + 10) benutzt wird.

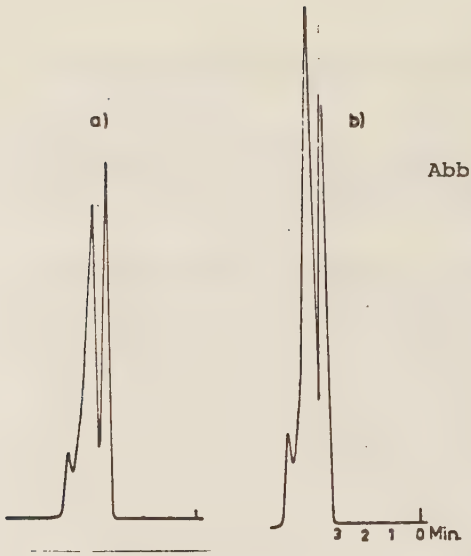


Abb. 17: HPL-Chromatogramm von Guajazulen
a) Detektion bei λ -220 nm
b) Detektion bei λ -254 nm

Auch ein von Fa. Dragoco (Holzminden) bezogenes Guajazulen erwies sich bei der HPLC-dieses Mal mit dem Gerät 1080 B untersucht als sehr uneinheitlich.

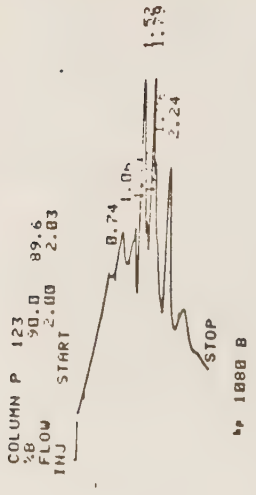


Abb. 18: HPL-Chromatogramm von Guajazulen Fa. Dragoco.
Hochdruckflüssigkeits-chromatograph
Hewlett-Packard 1080 B
Säule: RP-8 (240x4,6 mm), 7 µm
Fließmittel: Acetonitril/ Wasser (90+10)
Detektion: λ 360 nm
Durchfluß: 2 ml/min
Druck: 123 bar

Zunächst vermuteten wir ein Gemisch von 3,10-Dimethylisopropylazulen und 4,10-Dimethylisopropylazulen. Die zur Trennung der Peaks durchgeführten Versuche waren erfolglos.

Die separat aufgefangenen Peaks, erneut auf HPLC chromatographiert, ergaben wieder zwei Peaks, unabhängig davon, ob die Messungen bei 205, 220, 254 oder 280 nm durchgeführt wurden. Zu beachten war nur, daß die Peaks bei gleicher Konzentration wesentlich kleiner bei λ = 205 nm waren als in höherem nm Bereich. Außerdem erschienen bei λ = 254 nm die Peaks in umgekehrtem Verhältnis wie bei λ = 220 nm.

Weitere Untersuchungen mit gereinigten Guajazulenen - mehrmals rekristallisiert, lichtgeschützt - ergaben die gleiche Aufspaltung in zwei Hauptpeaks; die Begleitpeaks erschienen aber nicht mehr.

Die zwei Peaks sind nicht S-Guajazulen und Se-Guajazulen zuzuordnen, da letzteres nur unter strengen Bedingungen entsteht - Temp. über 350° C. Außerdem ist bei Galbanum-Harz-Destillat nur mit der Wirkung von Schwefel für die Bildung des Guajazulens zu rechnen, und bis jetzt ist in der Literatur nicht bekannt, daß unter diesen Bedingungen auch 3,10-Dimethylisopropylazulen entstehen kann.

Die HPLC-Untersuchungen des Chamazulens (gleiche Bedingungen wie Guajazulen), das eine ähnliche Struktur wie Guajazulen aufweist, hat das gleiche Problem gestellt: es erschienen wieder zwei Peaks, die nicht getrennt zu gewinnen waren.

Gaschromatographisch (Säulentemperatur 160°C isotherm) zeigte Chamazulen nur einen Peak.

Noch zu berichten wäre folgende Beobachtung: Guajazulen wurde in Ether gelöst, auf Kieselgel, feiner als 80 mesh, imprägniert und im Vakuum getrocknet.

Eluierte man das imprägnierte Kieselgel mit Petrolether, wurde das imprägnierte Guajazulen fast quantitativ wiedergewonnen. Wurde aber das imprägnierte Kieselgel mit Methanol eluiert, blieb das Kieselgel grün-braun gefärbt. Eine weitere Elution mit Ether führte zu einem grünlichen Produkt, das sich in IR, MS, DC und HPLC gleich wie die blaue Fraktion darstellte. Nach diesen zwei Elutionen blieb das Kieselgel dunkelbraun. Diese dunkel-bräunliche Substanz weist im HPLC auf Begleitpeaks des Guajazulens hin und bleibt bei DC an der Startlinie.

Falls Kieselgel zum Abbau des Guajazulens führen sollte, bleibt die Frage offen, warum diese Ereignisse nur bei der Elution mit Methanol zu beobachten sind.

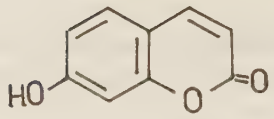
V.5 Zusammenfassung

- Als Azulenogene wurden zwei Substanzen isoliert, die bei Behandlung mit geringer Menge Schwefel Guajazulen liefern.
- Es wurde nachgewiesen, daß die azulenogenen Substanzen aus Galbanum-Harz zu Guajazulen führen, nur wenn sie mit Zusatz von S (Se oder Pd) bis 280° C erhitzt werden. Einmal erhitzte azulenogene Substanz gibt auch nach Zugabe von Schwefel und erneutem Erhitzen keine blaue Färbung.

Literatur

1. Wichtl, M., Planta med. 11, 53 (1963)
2. Pesnelle, P., Teisseire, P. und Wichtl, M., Plante med. 4, 403, (1964)
3. Yoshioka, H., Mabry, J. T., Timmermann, N. B., Sesquiterpene Lactones, University of Tokyo Press, 1973, S. 39/46
4. Burell, J. W. K., Lucas, R. A., Michalkiewicz, D. M. Riezebos, G., Tetrahedron Letters 30, 2837 (1971)
5. Rodriguez, E., Yoshioka, H. and Mabry, T. J., Phytochem. 10, 1145 (1971)

VI.1 Über Umbelliferon in Galbanum-Harz = Substanz H_2



$C_9H_6O_3 = H_2$

7 - Hydroxycumarin

Sommer[1] erhielt durch trockene Destillation, Mößmer[2] durch HCl-Behandlung von Galbanum-Harz Umbelliferon.

Tschirsch und Conrady[3] isolierten es nach Spaltung des Harzes mit verdünnter Schwefelsäure.

Kunz und Wöldicke[4] isolierten "Galbanumsäure", die im Vacuum auf 280 - 300° C erhitzt, sowie bei Verseifung mit Eisessig - Schwefelsäure Umbelliferon lieferte.

Die weiteren von ihnen isolierten Substanzen, Neutralkörper I und II genannt, bilden bei der Verseifung ebenfalls Umbelliferon.

VI.2 Identifizierung von Umbelliferon nach HPLC-Trennung durch DC

Bei der Detektion der Umbelliferon-Peaks aus Galbanum-Harz-Extrakten wurde die HPLC-Elutionsflüssigkeit aufgefangen, UV-Spektren wurden gemessen; anschließend wurde im Vakuum unterhalb 40° C eingeengt und auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. Der Rf.-Wert der Substanz auf der DC Platte

(Fließmittel Chloroform+Methanol (98 + 2) und die UV-Spektren sind identisch mit denen von Umbelliferon. Auch die Reaktion direkt auf der DC-Platte mit äthanolischer 5 %-iger Lösung von KOH entspricht der von Umbelliferon.

VI.3 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen von Umbelliferon

Arbeitsbedingungen:

I. Standardmethode: rel. Feuchtigkeit 50 %, Temperatur 20° C
II. Stationäre Phase: Kieselgel F_{254}-Fertigplatten
III. Fließmittel: Chloroform + Methanol (98 + 2); KS
IV. Nachweis: 1. UV_{365}; Umbelliferon zeigt hellblaue Fluoreszenz
V. Untersuchungslösung: je 1 g zerkleinertes Galbanum-Harz wird in 5 ml Methanol, Aceton, Ether oder Chloroform gelöst. (lichtgeschützt). vom Filtrat trägt man 10 µl auf.
VI. Referenzlösung: 10 mg Umbelliferon werden in 1 ml Chloroform + Methanol (1 + 1) gelöst. Auftragmenge 1 und µl.

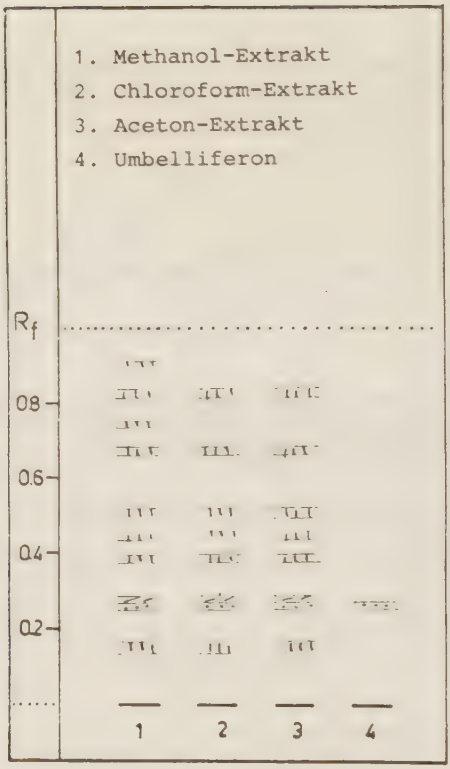
Ergebnisse: in allen Extrakten ist Umbelliferon nachweisbar, Abb. 19.

VI.4 HPLC für Umbelliferon aus Galbanum-Harz

Analytische HPLC

Säule: LiChrosorb^R RP-8; 7 µm (250 X 4,6 mm)
RP-18; 7 µm (250 X 4,6 mm)

Durchfluß: 1 ml/Min. und 1,5 ml/Min.



blaue Fluoreszenz
hell grün-blaue Fluoreszenz
dunkelblaue Fluoreszenz

Abb. 19: Chromatogrammschema von Galbanum-Harz-Extrakten: Das DC wurde in Chloroform/Methanol (98 + 2) entwickelt, mit einer 5 % ethanolischen Lösung von KOH besprüht und dient zur Identifizierung des Umbelliferons

Fließmittel: Methanol + Wasser und Acetonitril + Wasser
Detektion: Photometer bei 205, 210, 220, 254 und 320 nm.

Untersucht wurden Methanol-, Petrolether (30/50)-, Diethylether- und Chloroform-Extrakte des Galbanum-Harzes.
Als Referenzsubstanz diente durch Zonenschmelzen gereinigtes Umbelliferon (Abb. 20).

Die Ausgangssubstanz (Umbelliferon, Grade II.No.U-7626 der Fa. Sigma) die laut DC und HPLC sehr unrein war, wurde zuerst mit einem Gemisch von Dichlormethan und wenig Methanol gewaschen, dann aus Dichlormethan-Methanol (1 + 1) rekristallisiert und zuletzt durch Zonenschmelzen im Vacuum bei 260° C (System Prof. Schildknecht) rein gewonnen.

VI.5 Erstellung der Eichgerade

Zur Erstellung der Eichgerade werden je 20 µl Umbelliferonlösung in Methanol + Wasser (45 + 55) abgestuft von 0,5 bis 0,1 mg/ml chromatographiert. Die Mittelwerte aus jeweils drei Messungen ergeben die Eichgerade[5].

VI.6 Quantitative Auswertung der HPL-Chromatogramme verschiedener Galbanum-Harz-Extrakte

Die quantitative Auswertung des Umbelliferons, erfolgt nach der Methode des externen Standards, ergab, daß das Galbanum-Harz 0,037 % Umbelliferon enthält.

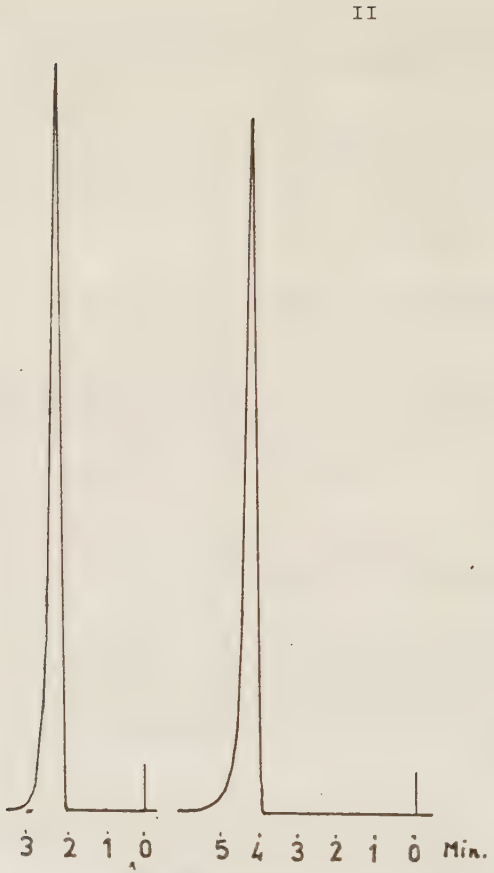


Abb. 20: HPL-Chromatogramm des Umbelliferons
Säule: RP-8 (7 µm)
Fließmittel: I. Methanol/Wasser 80 + 20
II. Methanol/Wasser 45 + 55
Detektion: λ-254 nm

Zu beachten sind die Verschiebungen der Retentionszeit und die Empfindlichkeit (Konzentration 0,5 mg/ml)

VI.7 Zusammenfassung

- Es wurde ein HPLC-DC System entwickelt, um quantitativ im Galbanum-Harz-Extrakt (bzw. in Extrakten, die Umbelliferon enthalten) Umbelliferon zu identifizieren. Gleichzeitig wurde mit Eichgerader bzw. externem Standard Umbelliferon quantitativ im Galbanum-Harz bestimmt.
- Es wurde erstmals bewiesen, daß Umbelliferon ein genuiner Bestandteil des Galbanum-Harzes ist.

VI.8

Literatur

1. Sommer, C., Arch. Pharm. 98, 1 (1859)
2. Mößmer, P., Ann. Chem. Pharm. 119, 257 (1861)
3. Tschirsch, A. und Conrady, A., Arch. Pharm. 232, 98 (1894)
4. Kunz, K., Wöldicke, E., Ber. dtsch. chem. Ges. 2, 70 (1937)
5. Graf, E. und Alexa, M., Arch. Pharm. 313, 285/6 (1980)

VII.1 Isolierung und Identifizierung der bei der trocknen Destillation erhaltenen Kristalle

Extrakte aus dem Galbanum-Harz liefern bei der Trockendestillation eine Substanz, die schon direkt im Kühler kristallisiert. Zur Gewinnung dieser Verbindung wurde das filtrierte Extrakt vom organischen Lösungsmittel befreit und anschließend bei normalem Druck destilliert. Bis 100° C erhält man kein Destillat. Steigt die Temperatur auf 170° C, wird ein gelb gefärbtes Öl gewonnen, bei über 200° C ein bräunliches und bei über 260° C ein dunkelblaues. Bei der Destillation des blauen Öles sind explosionsartige Geräusche zu hören. Direkt im Kühler lagern sich Kristalle ab. Durch Waschen mit Petrolether (30/50) werden die Kristalle von dem blauen Öl befreit; dann werden sie aus Aceton/Dichlormethan rekristallisiert. Die isolierte Substanz hat einen gewürzhaften Geruch und schmilzt bei 65° C. Ihre Analysenwerte sprechen für $C_5H_8O_2$ (ber. 100,11; gef. durch MS 100). $C_{ber.}$ 60,05 %; $H_{ber.}$ 8,06 %; $O_{ber.}$ 31,88 %; $C_{gef.}$ 60,53 %; $H_{gef.}$ 8,99 %. Das Massenspektrum spricht für Tiglinsäure. Neben dem Molekülion m/e 100 ist die Fragmentierung spezifisch die einer ungesättigten aliphatischen Carbonsäure (m/e 83; m/e 55). Auch das physikalische und chemische Verhalten spricht für Tiglinsäure. Der Vergleich mit der authentischen Substanz (MS, IR, DC) bestätigte die angenommene Struktur.

Die Versuche, Tiglinsäure im Galbanum-Harz durch DC und HPLC als freie Substanz nachzuweisen, blieben erfolglos. Man muß beachten, daß sich Tiglinsäure durch Erhitzen von Angelicasäure leicht bildet. Aber auch Angelicasäure konnte nicht als freie Säure identifiziert werden.

Daraus ist zu schließen, das Tiglinsäure esterartig an ein acyclisches Monoterpen oder ein cyclisches Monoterpen oder Sesquiterpen gebunden ist.

Durch die Isolierung von zwei Verbindungen, die als Sesquiterpenester der Angelicasäure identifiziert wurden (S_1 und S_4), und durch das Erhitzen der Verbindung S_4 konnte nachgewiesen werden, daß Tiglinsäure nicht genuin ist. Tiglinsäure entsteht bei Erhitzen des Angelicasäureesters.

VII.2 Dünnschicht-Chromatographie der Tiglinsäure

Tiglinsäure läßt sich mit der von uns entwickelten DC-Trennung für Galbanum-Harz (mobile Phase Chloroform/Methanol 98 + 2) nur dann nachweisen, wenn die Auftragmenge hoch dosiert ist ($\simeq$ 20 µg). Die Detektion erfolgt bei 254 nm. In Extrakten des Galbanum-Harzes war Tiglinsäure nicht nachweisbar. Dagegen war die Identifizierung in den Destillaten einwandfrei. Die Kopplung mit HPLC bestätigte die dc-Analyse.

VII.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie der Tiglinsäure

Analytische HPLC: Säule LiChrosorb^R RP-18 oder RP-8
(250 x 4, 6 mm; 7µm)
Fließmittel: Methanol/Wasser/Acetonitril und Methanol/Wasser
Detektion: λ = 205 bzw. 254 nm

Untersucht wurden Methanol-, Aceton-, und Diethylether-Extrakte des Galbanum-Harzes und ihre Destillate.

Als Referenzsubstanz diente Tiglinsäure der Fa. Riedel De Haen (Art. 63102).

VII.4 Zusammenfassung

- Aus dem Destillat des Galbanum-Harzes wurde erstmals Tiglinsäure isoliert und identifiziert.

- Es wurde nachgewiesen, daß Tiglinsäure nicht genuin vorliegt, sondern sich aus Angelicasäureestern bildet.

- Es wurde ein HPLC-Verfahren entwickelt, um qualitativ Tiglinsäure zu identifizieren und gleichzeitig quantitativ zu bestimmen.

VIII.1 Isolierung und Identifizierung des Sesquiterpen-umbelliferonethers aus Galbanum-Harz

Wie unsere Untersuchungen zeigten (Kap. IV.5, IV.6; IV.6.1 und IV.7) sind bei der Isolierung der Bestandteile des Galbanum-Harzes Säuren, Alkalien und hohe Temperaturen zu vermeiden. Mit schonenden Verfahren jedoch sind die ursprünglichen Komponenten zu gewinnen. Zur Ermittlung eines für Sesquiterpen-umbelliferonether am besten geeigneten Extraktionsverfahrens sowie zur Überprüfung des Extraktionsergebnisses wurde eine Kopplung DC - HPLC eingesetzt.

VIII.2 Gewinnung der Sesquiterpen-umbelliferonether-Franktion

Das gemahlene Galbanum-Harz (10 gr.) wird dreimal mit je 100 ml Petrolether (30/50) zwei Stunden lang unter Magnetrührung extrahiert. Das Dekantat wird abfiltriert und im Vacuum bei 30° C eingeengt. Es wird eine hellgelbe, ölige Fraktion gewonnen. Die DC - HPLC - Kopplung (Abb. 8) zeigt, daß im Petrolether-Extrakt kaum die Sesquiterpen-umbelliferonether H_1 und H_3 vorhanden sind. Teilweise sind die Komponenten H_4 und H_5 und besonders gut die Substanz H_7 extrahierbar. Diese Fraktion ist lichtempfindlich. Nach etwa 48 Stunden tritt eine grünliche Farbe auf, die nach mehreren Tagen braun bis dunkelbraun wird. Wenn die Fraktion kühl und lichtgeschützt gelagert wird, verlaufen diese Farbänderungen langsamer.

Um weitere Komponenten zu gewinnen, wird eine Extraktion mit Diethylether durchgeführt, dreimal je eine Stunde lang mit 100 ml Ether. Nach Abfiltrieren der vereinigten Ether-

Extrakte wird die im Vacuum eingeengte, gelbe, visköse Flüssigkeit mit Petrolether ausgewaschen. Die in Ether unlöslichen Teile enthalten eine höhere Konzentration an den Substanzen H_4 und H_5. Nach Abziehen des Lösungsmittels verbleiben 1,81 gr (entsprechend 18,1 % des Galbanum-Harzes). Der Rückstand nach diesen zwei Extraktionen wird anschliessend zweimal mit je 100 ml Methanol extrahiert. Der filtrierte Extrakt wird in einem Schütteltrichter mit Petrolether ausgewaschen und anschließend im Vacuum bei max. 40° C eingeengt. Nach Abziehen des Methanols verbleiben 1,3 gr (entsprechend 13 % des Galbanum-Harzes). Der rötliche methanolische Extrakt ist, wie die DC-HPLC Bestimmungen zeigen, reich an den Komponenten H_1 bis H_5. Bedeutend ist die Konzentration des Hauptsesquiterpen-umbelliferonethers H_1.

VIII.3 dc-Anaylse der Extrakte

Detektion des Sesquiterpen-umbelliferonethers

Wie in Kap. III beschrieben wurde, können mittels Dünnschichtchromatographie alle Hauptbestandteile des Galbanum-Harzes, die im kurzwelligen UV-Bereich (365 nm) fluoreszieren, ohne Sprühreagenzien nachgewiesen werden.

Weiterhin ist es möglich, dc. nachzuweisen, was für die Strukturaufklärung von großer Bedeutung ist, daß die Komponenten H_1, H_3, H_4, H_5 und H_7 Umbelliferon als Teilstruktur enthalten. Dies kann direkt auf der DC-Platte auf zwei Wegen erreicht werden:

a) Die DC-Platte mit den aufgetragenen Substanzen H_1 bis H_7 wird zunächst entwickelt (mobile Phase Chloroform/Methanol 98 + 2)-DC 1.Dimension. Die fluoreszierenden Flecke werden im UV-Licht bei 365 nm betrachtet. Dann wird die DC-Platte zehn Minuten lang auf 140° C erhitzt. Nach Abkühlen der Platte wird eine zweite Entwicklung - 2. Dimension - vorgenommen und die Platte mit 5 %-iger ethanolischer KOH besprüht, damit nimmt die Fluoreszenz des Umbelliferons stark zu. Bei Betrachten im UV-Licht bei 365 nm kann Umbelliferon, das durch Erhitzen abgespalten wurde, bei allen oben angegebenen Verbindungen nachgewiesen werden.

b) Eine DC-Platte mit den aufgetragenen Substanzen H_1 bis H_7 und der Referenzsubstanz Umbelliferon wurde vor der Entwicklung zehn Minuten lang auf 140° C erhitzt. Nach Abkühlen der Platte wurde das DC entwickelt (mobile Phase wie oben) und im UV-Licht bei 365 nm betrachtet. Es ist festzustellen, daß Umbelliferon aus allen aufgetragenen Substanzen H_1, H_3, H_4, H_5 und H_7 abgespalten ist. Dies wurde durch Kopplung DC-HPLC, UV-Messungen und MS bestätigt.

Die zwei noch blau fluoreszierenden Verbindungen H_6 und H_8 scheinen ebenfalls Umbelliferon zu enthalten, wozu jedoch wegen Mangels an Substanz keine eindeutige Aussage gemacht werden kann. Nach Erhitzen von H_1 sind H_6 und H_8 nachweisbar (DC) und sie müßten eine ähnliche Struktur wie die Komponenten H_1 bis H_7 besitzen. Die UV-Messungen nach DC und Extraktion der abgekratzten Fleke des H_6 und H_8 sprechen für Umbelliferonderivate.

VIII.4 Zur Extraktion der Komponenten H_1 bis H_5

Die durchgeführten Extraktionen zeigen, daß außer Petrolether (der die Sesquiterpen-umbelliferonether wenig löst) und teilweise Diethylether kaum andere Lösungsmittel selektiver sind. Gezielt einzeln extrahieren (auch mit Gradient-Verfahren) ließ sich nur die Substanz H_1.

Jedoch sind die Messungen DC-HPLC eine große Hilfe, um gezielt eine bestimmte Gruppe von Bestandteilen extrahieren zu können. Eine an den Substanzen H_1 bis H_5 reiche Fraktion ist nur dann zu gewinnen, wenn das Galbanum-Harz zuerst mit Petrolether und dann Diethylether erschöpfend extrahiert wird. Der ungelöste Anteil wird weiter mit Methanol extrahiert, wobei große Mengen von Substanz H_1 zu gewinnen sind. Der methanolische Extrakt muß mit Petrolether ausgewaschen werden, wenn die an den Komponenten H_1 bis H_5 reiche Fraktion möglichst frei von anderen Begleitstoffen sein soll.

IX.1 Isolierung und Strukturaufklärung von H_1

Die Gewinnung von Substanz H_1 gelang auf zwei Wegen.

A. Nach der Extraktion des gemahlenen Galbanum-Harzes mit mit Petrolether (30/50) und Ether, wobei auch eine kleine Menge der Substanzen H_1 bis H_5 gelöst werden, wird weiter mit Dichlormethan und Methanol extrahiert. Der methanolische Extrakt wird mit Petrolether ausgeschüttelt, eingeengt und der Rückstand mit Ethylether gewaschen. Der ungelöste Teil wird wiederholt in wenig Methanol gelöst und mit Ethylether gemischt, bis ein feines Pulver ausfällt. Das abfiltrierte gelbliche Pulver wird direkt auf dem Filter mit Ethylether gewaschen und anschließend in Dichlormethan/Methanol (2 + 1) aufgenommen. Langsam bilden sich weiß-gelbliche Kristalle. Nach mehrmaligem Rekristallisieren aus Dichlormethan/Methanol wird die Substanz H_1 DC- und HPLC-rein gewonnen (Abb. 21).

B. Als zweiter Weg wurde der Methanol-Extrakt des Galbanum-Harzes chromatographiert. Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 feiner als 230 mesh ASTM (Fa. Merck Art. 7729). Das Kieselgel wurde in Chloroform/Methanol (96 + 4) in einem Becherglas (800 ml) bis zur Sirupkonsistenz angerührt und in eine offene Säule mit G_3-Fritte zu etwa 90 % des Volumens gefüllt.

Etwa 2 gr methanolischer Extrakt aus getrocknetem Galbanum-Harz wurden in etwa 5 ml Dichlormethan/Methanol (1 + 1) gelöst und mit Kieselgel 60, feiner als 230 mesh, zur totalen Absorption angerührt. Das imprägnierte Kieselgel wurde im Vacuum bei 30° C getrocknet und auf die oben vorbereitete Säule gebracht. Durch diskontinuier-

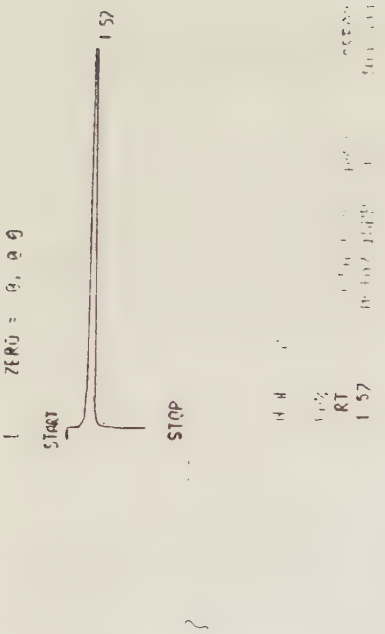


Abb. 21: HPL-Chromatogramm des Sesquiterpen-umbelliferonethers
H_1 Hochdruckflüssigkeitschromatograph Varian 5000
Säule: RP-18 Merck (40000 Bodenzahl); Detektor: λ -280 nm
Fließmittel: Methanol + Wasser (90 + 10), 1 ml/min.
Papiervorschub: 0,5 cm/min.
Empfindlichkeit: Att 8 (Rechner-Integrator HP -3390 A)

liche Gradienteluierung mit Chloroform/Methanol wurde gute Trennbarkeit erreicht. Mit einer mobilen UV-Lampe wurde die Trennung direkt auf der Säule Schritt für Schritt beobachtet. Die Fraktion, die H_1 enthält, kam am Ende der Trennung. Die Teilfraktionen, die die Substanz H_1 (DC und HPLC rein) enthielten, wurden vereinigt und im Vacuum eingeengt. Die weiße bis schwach gelbliche, getrocknete Substanz wurde in 5 ml Dichlormethan/Methanol (1 + 1) augenommen und offen zum Kristallisieren stehen gelassen.

Die isolierten weißen bis schwach gelblichen, kubischen Kristalle haben einen Schmelzpunkt von 175° C und zeigen einen Molekularpeak bei M^+ 400.

Nach der Elementaranlyse handelt es sich um $C_{24}H_{32}O_5$
$MG_{ber.}$ 400, 485: $C_{ber.}$ 71,97 %; $H_{ber.}$ 8,05 %; $O_{ber.}$ 19,97 %;
$C_{gef.}$ 71,80 %; $H_{gef.}$ 7,98 %.

Das UV-Spektrum zeigt in ethanolischer Lösung eine kräftige Absorptionsbande bei λ = 324 nm und ist dem UV-Spektrum des Umbelliferon-methylethers ähnlich.
Das IR-Spektrum (Abb. 22) der Verbindung H_1 zeigt:
in der Carbonylregion liegen drei kräftige Absorptionsbanden bei 1725, 1690 und 1610 cm^{-1}. Die Absorptionsbanden bei 1725 cm^{-1} sind für die C=O-Valenzschwinung der γ-Pyrone charakteristisch. Die Absorption bei 1275 - 1150 und 1120 - 1030 cm^{-1} (=C-O-C-Valenzschwingung) weist auf asymetrische aromatische Ether hin.

Mehrere Banden zwischen 8 und 9 µm sind dem ungesättigten Teil der Ether-Verbindung zuzuordnen. Die Absorption zwischen 9 und 10 µm gehören zu dem gesättigten Anteil des

Esters. Diese breite, starke Absorption wird von den asymetrischen gekoppelten C-O-C-Valenzschwingungen hervorgerufen.

Der Nachweis einer aromatischen Verbindung ist die auf Skelettschwingungen zurückgehende Absorption bei 1610 und 1500 cm^{-1}. Die Absorption bei etwa 1600 cm^{-1} ist normalerweise schwach, wird aber durch den Elektronenschub der Doppelbindung der γ-Pyrone stark intensiviert. Das Auftreten einer weiteren Absorption bei etwa 1555 cm^{-1} weist auf diesen Elektronenschub hin.

Von großem Aussagewert sind die charakteristischen C-H Schwingungen (Banden bei etwa 825 cm^{-1}). Die höhere Wellenzahl ist ein Hinweis auf die Beteiligung weniger Wasserstoffatome (n = 2), die ihre Schwingungen in einer einzigen Bande vereinigen. Die Valenzschwingung der Olefindoppelbindung der γ-Pyrone erscheint bei 1690 cm^{-1}. Das Auftreten von O-H Valenzschwingungen bei etwa 3370 und 3340 cm^{-1} ist freien Hydroxylgruppen zuzuordnen, ebenso die "Alkoholbande" bei 1280 cm^{-1}, die einer γ-OH Schwingung entspricht und von der (C-O)-Bande bei etwa 1075 cm^{-1} beeinflußt wird. Die Banden bei 1200 und 1155 cm^{-1} sind typisch für mehrere Methylgruppen an einem gemeinsamen Kohlenstoff.

Unter Berücksichtigung der diskutierten UV und IR-Daten und durch Vergleich der ^{1}H-NMR-Spektren mit den in der Literatur beschriebenen Sesquiterpen-umbelliferonethern Farnesiferol[1], Feterin[2], Coladonin[3] und einer ähnlichen Verbindung aus Ferula microcarpa[4] sowie auch mit weiteren Diterpenen wie Albicanol[5], Dimeno[6], Concinndiol[7], Aplysin-20[8], Isoconcinndio[9], den Diterpenen vom Labdan-Typ aus Stevia rebaudiana[10] und Diterpenoiden aus Sideritis foetens[11],

läßt sich schlußfolgern, daß ein 7-O-substituiertes Umbelliferon mit einer sesquiterpenalkoholähnlichen Struktur vorliegt (Abb. 26). Weitere ^{13}C-NMR-Messungen bestätigen die Annahme. Die beiden Methylgruppen an C - 4' erscheinen bei 0.97 und 0.95 ppm. Die dritte Methylgruppe in der C - 10' Stellung tritt als Singulett bei 0,86 ppm auf. Die vierte Methylgruppe in der C - 8' Stellung erscheint bei 1,23 ppm. Zwischen δ = 4,1 und 4,3 ppm treten die Signale des -C-CH_2-O- auf. Das OH-Proton des C - 3' shiftet im Bereich um 3,43 ppm. Das Proton der zweiten Hydrxylgruppe, an C - 8 gebunden, tritt im Bereich um 1,92 ppm auf. Das ^{1}H-NMR-Spektrum zeigt eindeutig die für den Umbelliferonanteil bekannten Signale. (Abb. 23)

Die drei Protonen des Aromatenrings H-5, H-6, H-8 und die anderen zwei Protonen des γ-Pyrons erscheinen im Bereich von 7,68 bis 6,10 ppm.

Der Rest des Moleküls $C_{15}H_{27}O_2$ / $C_{24}H_{32}O_5$ - $C_9H_5O_3$ (Umbelliferon) / besteht nach der Analyse der off-resonance entkoppelten Aufnahme Abb. 24[x] aus:

drei quartären C - Atomen (davon ein C - O)
drei tertiären C - Atomen (davon ein CH - O)
fünf sekundären C - Atomen (davon ein CH_2-O)
vier Methyl-C-Atomen.

Im Bereich des Sesquiterpenanteils treten keine zusätzlichen Alken-C-Atome auf. Anhand des Vergleichs der ^{13}C-Verschiebungen des H_1 mit seinem Eliminierungsprodukt H_5 $(C_{24}H_{30}O_4)^x$ und Umbelliferon lassen sich alle Verschiebungsänderungen des Cyclohexanrings erklären und ermöglichen somit einen endgültigen Strukturvorschlag (Abb. 26).

x) Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Breitmaier für die freundliche Aufnahme und Interpretation dieser Spektren.

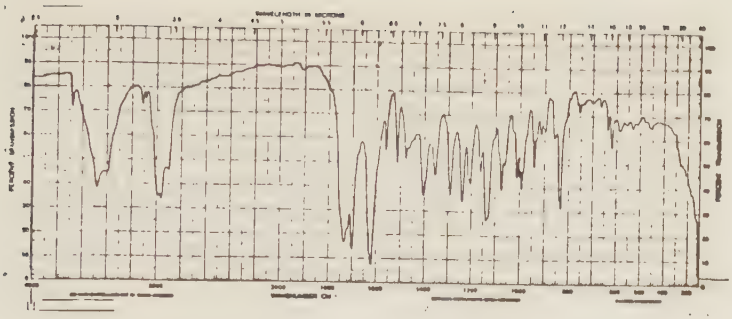


Abb. 22: IR-Spektrum des Naturstoffs H_1
KBr-Preßling, Beckman -Photometer IR-20 AX

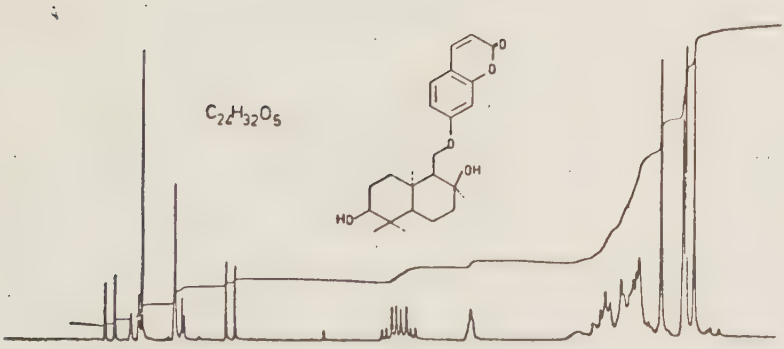


Abb. 23: 60 MHz-NMR-Spektrum des Naturstoffs H_1
in $CDCl_3$; Varian-A-60-NMR-Spektrometer

Das Massenspektrum des Naturstoffs H_1 Abb. 25 zeigt einen Molekularpeak bei M^+ 400. Das erste Folgefragment bei m/e 382 deutet auf die Abspaltung eines Moleküls Wasser. Ein weiterer Schritt ist die Abspaltung eines zweiten Moleküls Wasser, gefolgt von der Eliminierung des Umbelliferons (m/e 203). Der weitere Zerfall führt zu dem Basis-Peak m/e 162, charakteristisch für die Reihe dieser Sesquiterenumbelliferonether aus Galbánum-Harz.

Tabelle 2

Interpretation wichtiger Ionen im Massenspektrum des Naturstoffs H_1

m/e	Interpretation	%
400	M^+	20
382	$M - C_2O$ (18)	0,5
221	$M - H_2O; -C_9H_5O_3$ (18+161)	52
203	$M - H_2O; -C_9H_5O_3; -H_2O$	43
162	$M - C_{15}H_{26}O_2$	100

Ein plausibler Zerfallsweg für den Naturstoff H_1 ist im Schema 1 und 2 zusammengestellt.

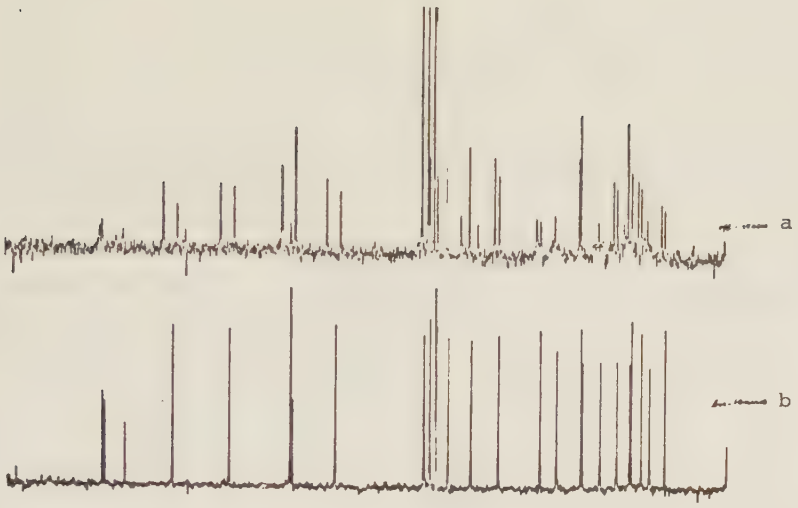


Abb. 24: ^{13}C-NMR-Spektrum des Naturstoffs H_1 in $CDCl_3$; Bruker WP-80-Fourier-NMR-Spektrometer; 20115 MHz für ^{13}C; 8000 MHz für ^{1}H-Entkopplung.
a) off-resonance-entkoppelt
b) breitband-entkoppelt

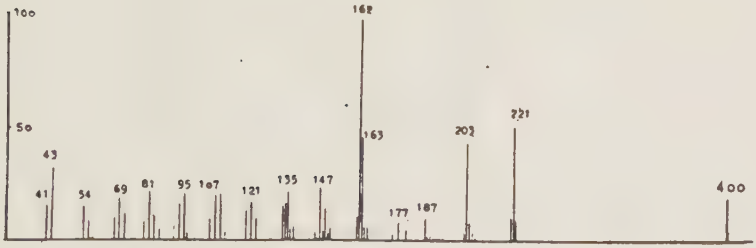


Abb. 25: MS des Naturstoffs H_1
Massenspektrometer der Fa. AEI, Typ MS 9
Ionenquellentemperatur 160°; Elektronen-Energie 70 eV.

Tabelle 1

Die chemischen Verschiebungen des ^{13}C-NMR-Spektrums des Naturstoffs H_1.

Zuordnung	H_1/ppm ($CDCl_3$)	Art der Gruppe
C - 2	162,0	-COO
C - 3	113,3	CH
C - 4	143,5	CH
C - 5	128,8	CH
C - 6	113,2	CH
C - 7	156,0	CO
C - 8	101,7	CH
C - 9	161,4	CO
C - 10	112,7	C-
C - 1'	25,2	$-CH_2-$
C - 2'	32,9	$-CH_2-$
C - 3'	75,6	CHO
C - 4'	38,0	C-
C - 5'	48,5	CH
C - 6'	20,0	$-CH_2-$
C - 7'	44,2	$-CH_2$ (T)x
C - 8'	72,7	CO (S)x
C - 9'	59,4	CH
C - 10'	37,5	C-
C - 11'	66,7	$-CH_2-O$
C - 12'	24,7	$-CH_3$
C - 13'	22,1	$-CH_3$
C - 14'	28,5	$-CH_3$
C - 15'	16,0	$-CH_3$

x) Off-resonance-Multiplizität
T = Triplett;
S = Singulett

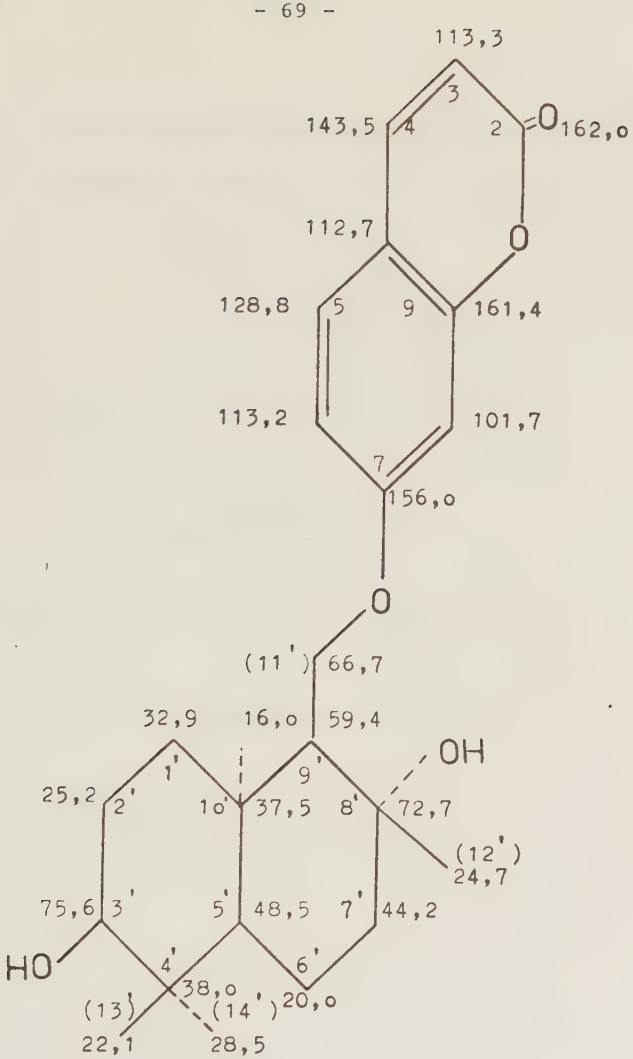
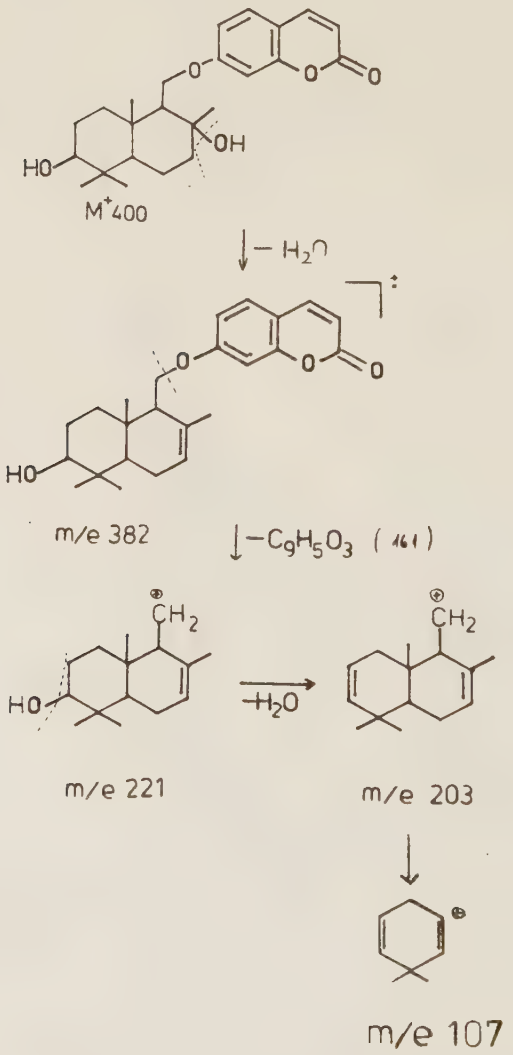
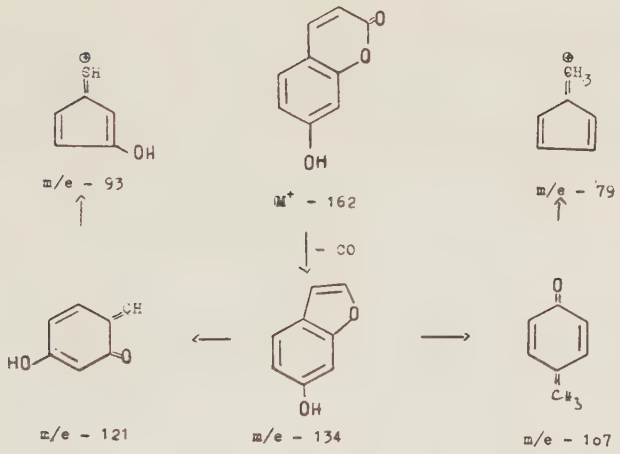


Abb. 26: ^{13}C-Signalzuordnung des Sesquiterpen-umbelliferon-ethers H_1

Schema 1:
Ein plausibler Zerfallsweg für den Naturstoff H_1



Schema 2:
Ein plausibler Zerfallsweg für den Umbelliferonanteil



IX.2

Literatur

1. Caglioti, L., Naef, H., Arigoni, D. und Jeger, O., Helv. Chim. Acta. 41, 2278 (1958)
2. Perelson, M. E., Socolowa, A. I. und Sklear, Yu. E., Khim. Prir. Soedin 318 (1978)
3. Pinar, M. und Rodriguez, B., Phytochemistry 16, 1987 (1977)
4. Golowina, L. A., Hasanow, T. H., Saidhodjaew, A. I., Khim. Prir. Soedin 566 (1978)
5. Toyota, M., Asakawa, Y. und Takemoto, T., Phytochemistry 20, 2358 (1981)
6. Ohta, Y., Andersen, N. H. und Liu, C. B. (1977), Tetrahedron 33, 617
7. Howard, B. M., Fenical, W., Finer, J. und Clardy, J., (1977), J. Am. Chem. Soc. 99, 6440
8. Yamamura, S. und Terada, T., (1977), Tetrahedron Letters 2171
9. Howard, B. M. und Fenical, W., Phytochemistry 19, 2774 (1980)
10. Sholichin, M., Yamasaki, K., Miyama, R., Yahara, S. und Tanaka, O., Phytochemistry 19, 326 (1980)
11. Garcia-Alvarez, M. C. und Rodriguez, B., Phytochemistry 19, 2405 (1980)

X.1 Isolierung und Strukturaufklärung von H_3

Der Naturstoff H_3 wurde mittels Säulenchromatographie (SC) und präparativer Schicht-Chromatographie (PSC) gewonnen.

Zur Isolierung der Verbindung H_3 wurde zunächst gemahlenes Galbanum-Harz erschöpfend mit Petrolether (30/50), Diethylether und Dichlormethan extrahiert. Eine weitere Extraktion mit Methanol führte zu einem Extrakt, der neben Substanz H_1 auch H_3 enthielt. Der Extrakt wurde abfiltriert und in Vacuum eingeengt. Etwa 2 gr eingeengter Extrakt wurden in 5 ml Chloroform aufgenommen, mit Kieselgel 60, feiner als 230 mesh, aufgesaugt und weiter unter Vacuum getrocknet. Als stationäre Phase für die SC diente Kieselgel 60 feiner als 230 mesh. Als mobile Phase diente Chloroform/Methanol (90 + 10). Für die Vorbereitung der Säule gilt die Beschreibung von Seite 60. Die Trennung wurde mittels einer mobilen UV-Lampe (bei 365 nm) beobachtet. Die Substanz H_3 fluoresziert dunkelblau. Die Fraktionen, die diese Substanz enthielten, wurden vereinigt und im Vacuum bei 35° C eingeengt. Die gewonnene gelbliche, getrocknete Fraktion wurde in wenig Chloroform aufgenommen und auf einem PSC aufgetragen. Als mobile Phase für die Entwicklung des PSC diente Chloroform/Methanol (95 + 5). Nach Entwickeln des PSC wurde im UV-Licht (365 nm) die dunkelblau fluoreszierende Zone markiert und weiter auf die übliche Weise mit Methanol eluiert, abfiltriert, eingeengt und zur Kristallisation in Methanol/Chloroform (1 + 1) stehen gelassen. Die isolierten kleinen weiß-gelblichen Kristalle, haben einen Schmelzpunkt von 93 - 94° C und zeigen einen Molekularpeak bei M^+ 396.

Nach der Elementaranalyse handelt es sich um $C_{24}H_{28}O_5$ (396, 489) Ber.C 72,70 H 7,11 Gef.C 72,58 H 7,09 Mol-Masse 396 (ms).

Das UV-Spektrum in methanolischer Lösung ähnelt dem von Umbelliferon und Naturstoff H_1.

Für den Umbelliferonanteil sind alle charakteristischen Absorptionsbanden in dem IR-Spektrum (Abb. 27) vorhanden: bei 1725 cm^{-1} C = O Valenzschwingung der γ-Pyrone, bei 1605, 1555 und 1505 cm^{-1} Valenzschwingungen des Aromaten. Die Beteiligung weniger Wasserstoffatome ist von der charakteristischen C - H Absorptionsbande bei 825 cm^{-1} indiziert. Die Valenzschwingungen bei etwa 1125 und 1275 cm^{-1} (=C-O-C) sprechen für einen asymmetrischen Ether. Absorptionsbanden bei etwa 3100 cm^{-1} sind einer freien Hydroxylgruppe zuzuordnen. Die Valenzschwingung bei 1155 cm^{-1} ist für mehrere Methylgruppen an einem gemeinsamen Kohlenstoff typisch. Charakteristisch für die Substanz H_3 ist die Absorptionsbande bei 1678 cm^{-1}, die für ein α, ß-ungesättigtes Keton im Diterpenanteil spricht[1,17]. Im gleichen Bereich absorbiert die Ketogruppe des α, ß-ungesättigten Diterpens Solidagogen[1], die fast dem Skelett des Sesquiterpenanteils des H_3 entspricht. Diese Absorptionsbande tritt bei H_1, H_4 und H_5 nicht auf.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum des H_3 zeigt große Ähnlichkeiten mit dem des Sesquiterpen-umbelliferonethers H_1 (Abb. 28). Unter Berücksichtigung der diskutierten UV- und IR-Daten sowie auch aus Vergleichen der ^{1}H-NMR, IR und UV-Spektren des Naturstoffs H_1 und der in der Literatur beschriebenen Substanz Solidagogen[1,2,3] wie auch des Sesquiterpen-umbelliferonethers aus Ferula nevskii[11] sowie des chemischen Verhaltens von H_3 läßt sich entnehmen, daß ein an 7 - O mit einen Diterpenoid substituiertes Umbelliferon vorliegt. Im Bereich von 7,70 - 6,21 ppm treten die bekannten Signale für den Umbelliferonanteil auf: δ=6,27 (S,H-3); δ=7,55 (S,H-4); δ=7,39 (S,H-5); δ=7,32 (S,H-6); δ=6,85 (S,H-8).

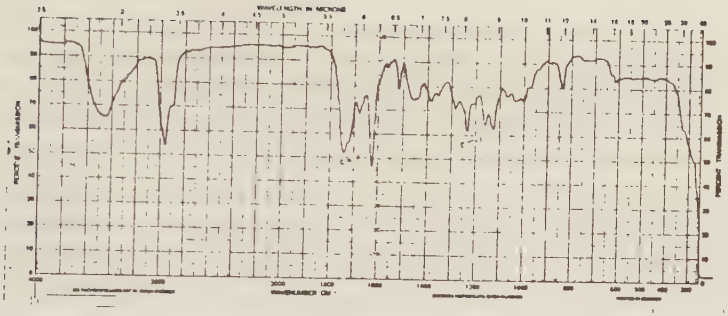


Abb. 27: IR-Spektrum des Naturstoffs H_3
KBr-Preßling, Beckman -Photometer IR-20 AX

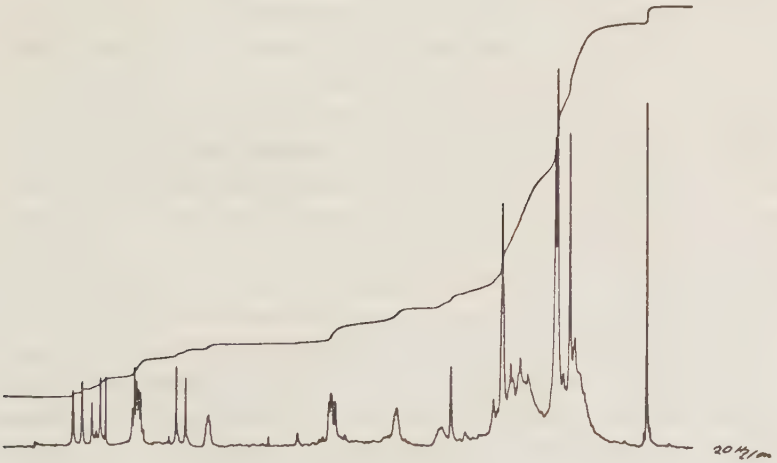


Abb. 28: 60 MHz-NMR-Spektrum des Naturstoffs H_3
in $CDCl_3$; Varian-A-60-NMR-Spektrometer

Zwischen 4,18 und 4,27 ppm treten die Signale des $-C-CH_2-O$ auf. Das OH-Proton des C-3' shiftet im Bereich um 3,43 ppm. Die beiden Methylgruppen an C-4' erscheinen bei 1,20 (ax) und 1,22 (eq.) ppm. Die dritte Methylgruppe in C-8' Stellung tritt als Singulett bei 1,96 ppm auf. Die vierte Methylgruppe in der C-10' Stellung erscheint bei 1,04 ppm. Das breite Signal bei 5,87 ppm ist den Verschiebungen des α-Vinyl-Protons H-7' zuzuordnen[1]. Diese Verschiebungen sind von der Carbonylgruppe beeinflußt[9,10].

Nach der Summenformel enthält die Verbindung H_3 elf Doppelbindungsäquivalente. Von diesen gehören sieben zu dem Umbelliferonanteil, wie aus den Signalen zwischen 101,30 und 161,29 ppm hervorgeht. Die Zuordnungen ergeben sich am einfachsten aus einem Verschiebungsvergleich mit Umbelliferon, Cumarinen[8,18] und den Naturstoffen H_1, H_4, H_5 und H_7. Aus dem ^{13}C-NMR-Spektrum des Naturstoffs H_3 Abb. 29 läßt sich entnehmen, daß diese Substanz ein Sesquiterpenumbelliferonether ist. Die Zuordnung der C-2 bis C-10-Signale ergibt sich aus einem Verschiebungs-Vergleich mit Umbelliferon. Der Sesquiterpenanteil enthält gegenüber dem Naturstoff H_1 drei Doppelbindungsäquivalente. Im ^{13}C-NMR-Spektrum der Substanz H_3 findet man eine Carbonylgruppe (200,02 ppm) sowie eine olefinische Doppelbindung (155,43 und 129,85 ppm). Das verbleibende Doppelbindungsäquivalent spricht zusammen mit den C-5', C-9' und C-10'-Resonanzen (57,34; 54,89; 36,50 ppm) für eine Cyclohexenonring Teilstruktur. Der Carbonyl-Kohlenstoff (200,02 ppm) ist im Vergleich zu Cyclohexanon (208,5 ppm) abgeschirmt. Ferner liegt eine der olefinischen Kohlenstoff-Resonanzen in sehr tiefem Feld (155,43 ppm). Infolgedessen befinden sich die Carbonylgruppe und die C=C-Doppelbindung in Konjugation (mosomerer Effekt der C=O Gruppe auf die C=C Doppelbindung).

Aus der off-resonance-Multiplizität sowie mit Hilfe der gegebenen Verschiebungen der Sesquiterpen-umbelliferonether H_1 und H_5, Cyclohexen, Cyclohexanon[12] gelingt die in Abb. 31 dargestellte Struktur weiter.

Das Massenspektrum des Sesquiterpen-umbelliferonethers H_3 zeigt den Molekularpeak bei M^+ 396 Abb. 31. Durch Eliminierung eines Moleküls Wasser bildet sich ein metastabiles Ion bei m/e 378. Es folgt die Abspaltung des Umbelliferons mit gleichzeitiger Eliminierung eines Protons zur Stabilisierung des Moleküls (m/e 216). Weitere Abspaltungen einer Methylgruppe bildet das Molekülion m/e 201. Der weitere Zerfall führt zu dem Basis-Peak m/e 162 wie bei Sesquiterpenumbelliferonether H_1. Der Zerfallsweg für die Substanz H_3 ist in folgendem Schema zusammengestellt:

Tabelle 4

m/e	Interpretation	%
396	M^+	3
378	$M - H_2O$	0,8
235	$M - C_9H_5O_3$	8
234	$M - C_9H_5O_3; -H$	16
216	$M - C_9H_6O_3; -H_2O;$	12
201	$M - C_9H_6O_3; -H_2O; -CH_3$	21
162	$M - C_{15}H_{22}O_2$	100

Ein plausibler Zerfallsweg für den Naturstoff H_3 ist in Schema 3 zusammengestellt.

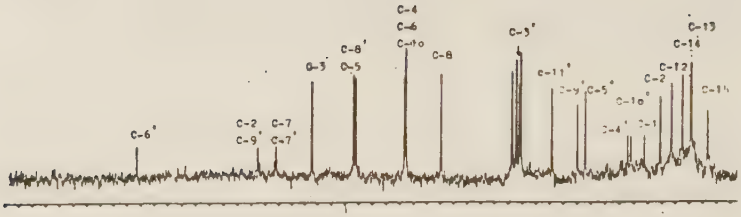


Abb. 29: ^{13}C-NMR-Spektrum des Naturstoffs H_3 in $CDCl_3$;

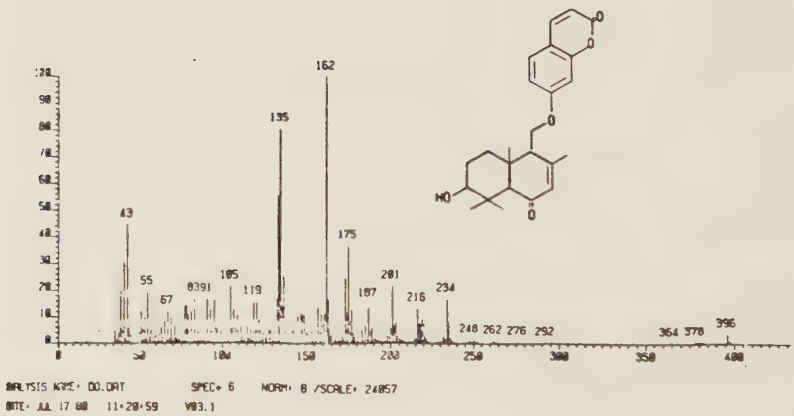


Abb. 30: MS des Naturstoffs H_3
Massenspektrometer der Fa. AEI, Typ MS 9
Ionenquellentemperatur 160°; Elektronen-Energie 70 eV

Tabelle 3

Die chemischen Verschiebungen des ^{13}C-NMR-Spektrums des Naturstoffs H_3

Zuordnung	H_3/ppm ($CDCl_3$)	Art der Gruppe
C - 2	161,29	-COO
C - 3	113,33	CH
C - 4	143,24	CH
C - 5	128,85	CH
C - 6	113,10	CH
C - 7	155,81	C-O-
C - 8	101,30	CH
C - 9	160,61	C-O-
C - 10	112,8	C-
C - 1'	31,54	CH_2
C - 2'	24,34	CH_2
C - 3'	76,09	CHO
C - 4'	40,74	C-
C - 5'	57,34	CH
C - 6'	200,02	=CO
C - 7'	155,43	=CH-
C - 8'	129,58	=C
C - 9'	54,89	CH
C - 10'	36,50	C-
C - 11'	65,62	CH_2
C - 12'	21,56	$-CH_3$
C - 13'	21,68	$-CH_3$
C - 14'	27,12	$-CH_3$
C - 15'	16,20	$-CH_3$

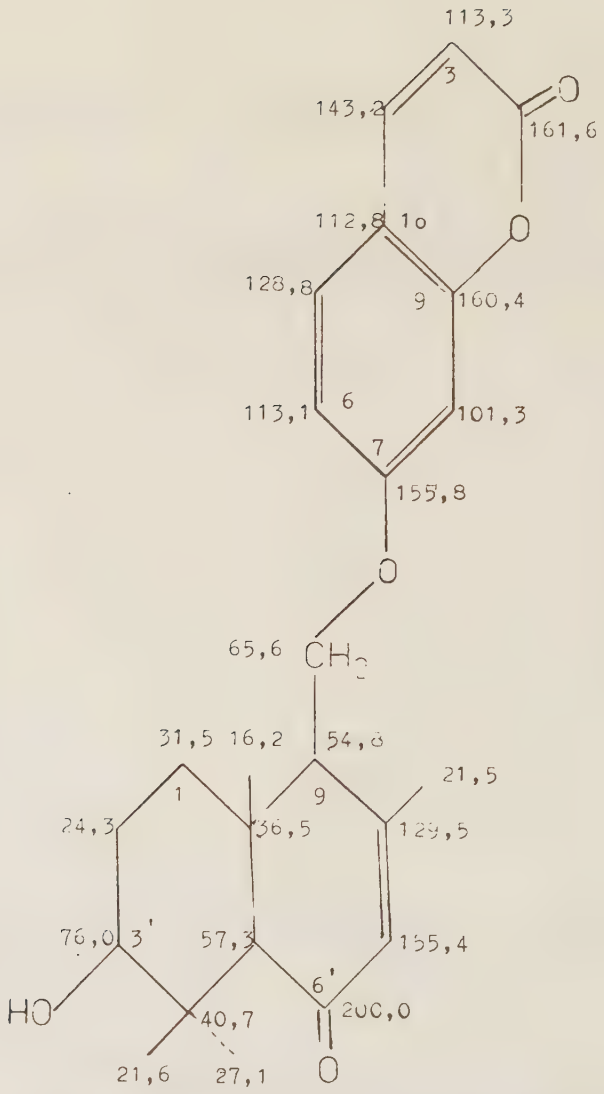
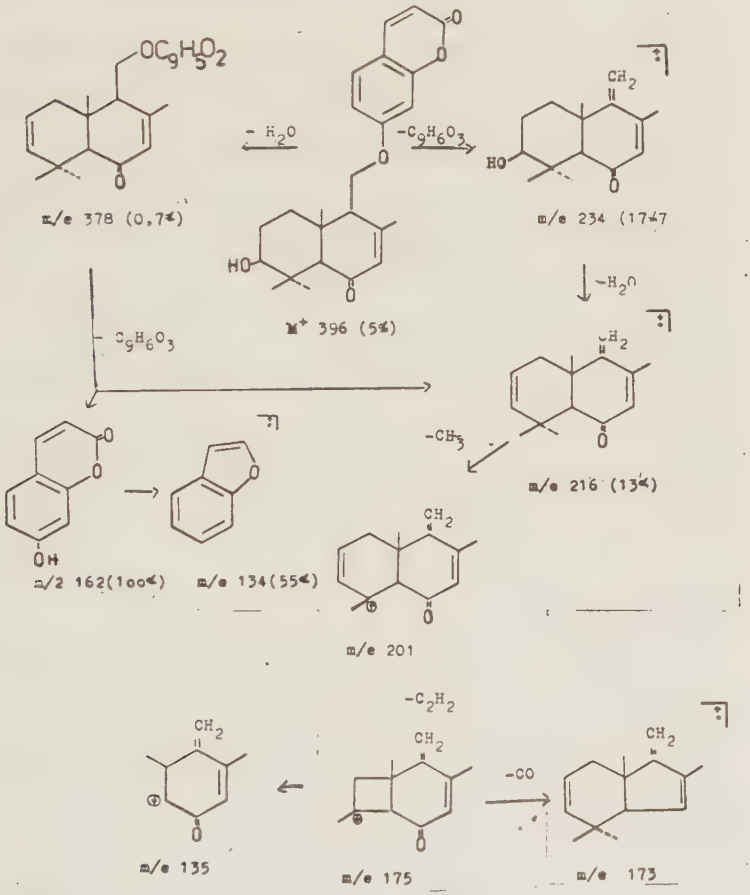


Abb. 31: ^{13}C-Signalzuordnung des Sesquiterpen-umbelliferonethers H_3

Schema 3:
Ein plausibler Zerfallsweg für den Naturstoff H_3



X.2

Literatur

1. Anthonsen, T., McCabe, P. H., McCrindle, R., und Murray, R. D. H., Tetrahedron 25, 2233, (1969)
2. Anthonsen, T., McCabe, R., McCrindle, R., Murray, R.D.H. und Young, G. A. R., Tetrahedron 26, 3091 (1970)
3. Bohlmann, F., Zdero, C., Gupta, R. K., King, R. M. und Robinson, H. Phytochemistry 19, 2695, (1980)
4. Bohlmann, F., Jakupovic, J., Robinson, H. und King, R. M. Phytochemistry 19, 2769, (1980)
5. Bohlmann, F., Fritz, U., King, R. M. und Robinson, H. Phytochemistry 19, 2655 (1980)
6. Rodriguez, B. und Savona, G., Phytochemistry 19, 1805 (1980)
7. Savona, G., Piozzi, F., Bruno, M. und Rodriguez, B., Phytochemistry 21, 2699 (1982)
8. Sakakibara, I., Okuyama, R., und Shibata, S., Planta. med. 44, 199 (1982)
9. Kulkarni, M. V., und Patil, V. D., Arch Pharm. (Weinheim) 314, 708 (1981)
10. Kulkarni, M. V., Pujar, B. G. und Patil, V. D., Arch. Pharm. (Weinheim) 316, 015, (1983)
11. Bagirov, V. Yu., Khim. Prir. Soed., 652 (1978)
12. Breitmeier, E. und Bauer, G., ^{13}C-NMR-Spektroskopie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1977
13. Weigert, F. J., Roberts, J. D., J. Am. Chem. Soc. 92, 1347 (1970)
14. Dorman, D. E., Jautelat, M., Roberts, J. D., J. Org. Chem. 36, 2757 (1971)
15. Herz, W. und Kulanthaivel, P., Phytochemistry 22, 715 (1983)
16. Her, W. und Kumar, N., Phytochemistry 20, 247 (1981)
17. Pinto, A. C., Silva, A. J. R., Mayer, L. M. U., und Braz, R. Phytochemistry 18, 2036 (1979)
18. Nicoletti, M., Monache, F. D. und Marini-Bettolo, G. B. Phytochemistry 20, 250 (1981)

XI.1

Isolierung und Strukturaufklärung von H_4

Die Gewinnung der Substanz H_4 wurde mittels Säulen- und präparativer Schicht-Chromatographie erreicht.

Zunächst wurde gemahlenes Galbanum-Harz erschöpfend mit Petrolether (30/50) extrahiert. Eine weitere Extraktion mit Diethylether führte zu einem Extrakt, der neben Substanz H_4 auch den Sesquiterpen-umbelliferonether H_5 und andere Verbindungen enthielt. Der Extrakt wurde abfiltriert und im Vacuum bei etwa 30° C eingeengt. Etwa 2 gr eingeengter Extrakt wurden in Dichlormethan (5 ml) aufgenommen, auf Kieselgel 60, feiner als 230 mesh, aufgesaugt und weiter im Vacuum getrocknet. Als stationäre Phase für die Säulenchromatographie diente Kieselgel 60 feiner als 230 mesh. Als mobile Phase diente n-Hexan/Ethylacetat 70 + 30 (v/v). Vorbereitung der Säule wie Seite 60. Die Trennung wurde mittels einer mobilen UV-Lampe (365 nm) beobachtet. Substanz H_4 fluoresziert hell blau. Die Fraktionen, die diese Substanz enthielten, wurden vereinigt und im Vacuum bei 35° C eingeengt. Die gewonnene Fraktion, die neben Substanz H_4 auch die Verbindung H_5 enthielt, wurde in wenig Dichlormethan aufgenommen und auf die präparative Kieselgelschicht aufgetragen. Als mobile Phase für die Entwicklung diente Chloroform/Methanol 98 + 2 (V/V). Nach Entwicklung des Chromatogramms wurde im UV bei 365 nm die hell fluoreszierende Zone der Substanz H_4 markiert und weiter auf übliche Weise mit Chloroform eluiert, abfiltriert, eingeengt und zur Kristallisation in Dichlormethan/Diethylether (1 + 2) stehen gelassen.

Die isolierten, weißen bis schwach gelblichen Kristalle haben einen Schmelzpunkt von 71 - 71,5° C und zeigen einen Molekularpeak bei M^+ 382. Nach der Elementaranalyse handelt

es sich um $C_{24}H_{30}O_4$, $MG_{ber.}$ 382,47; $C_{ber.}$ 75,41 %; $H_{ber.}$ 7,91 %; $C_{gef.}$ 75,28 %; $H_{gef.}$ 7,84 %.

Das UV-Spektrum des Naturstoffes H_4 ist dem des Sesquiterpen-umbelliferonethers H_5 ähnlich, ebenfalls das IR-Spektrum (Abb. 32). Vorhanden sind die Absorptionsbanden bei etwa 1725 cm^{-1}-Valenzschwingungen der γ-Pyrone-, 1610, 1510, 825 cm^{-1}, die für ein substituiertes Umbelliferon sprechen. Valenzschwingungen bei etwa 3470 cm^{-1} sind einer Hydroxylgruppe zuzuordnen. Weitere Absorptionsbanden zwischen 1240 und 1100 cm^{-1} weisen auf einen asymmetrischen aromatischen Ether hin.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum des Naturstoffs H_4 (Abb. 33) zeigt in dem aromatischen Bereich gleiche Verschiebungen wie der Sesquiterpen-umbelliferonether H_1, H_3, H_5 und H_7.

Das breite Signal bei etwa 5,46 ppm ist den Verschiebungen des Protons H - 7' zuzuordnen[1], ähnlich wie bei der Verbindung H_5. Bis auf das Proton der alkoholischen OH-Gruppe bei 3,40 ppm, welches C - 3' zugeordnet ist, ist das Protonen-Spektrum des Naturstoffes H_4 mit geringer Abweichung ähnlich dem ^{1}H-NMR-Spektrum des Sesquiterpen-umbelliferonethers H_5. Diese chemischen Verschiebungen beziehen sich auf die "trans"- und "cis"-Anordnung. Vergleiche mit den in der Literatur beschriebenen Verschiebungen bei der Orientierung der Hydroxylgruppe in C-4-Stellung bei Cryptomeridiol[2] wie auch mit ^{1}H-NMR-Messungen an den Sesquiterpenen aus Asa foetida[3,4], Ferula nevskii[5], Ferula microcarpa[6] und den isolierten Verbindungen H_1, H_3, H_5 und H_7 (aus Galbanum-Harz) sowie ^{13}C-NMR-Messungen sprechen für eine trans-Anordnung der in C - 3' angeordneten Hydroxylgruppe.

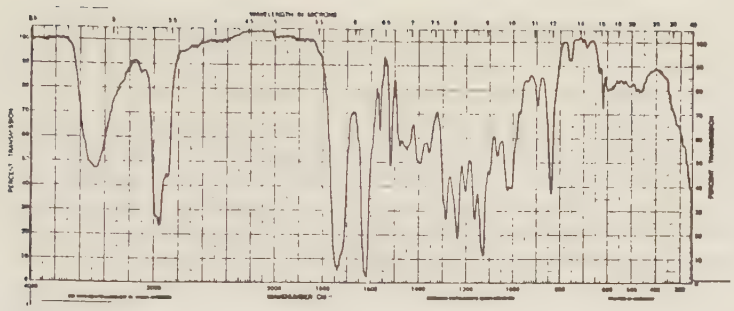


Abb. 32: IR-Spektrum des Naturstoffs H_4
KBr-Preßling, Beckman -Photometer IR-20 AX

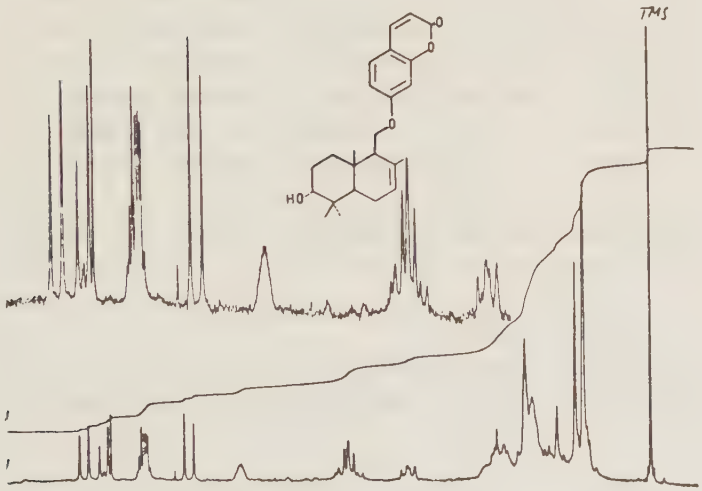


Abb. 33: 60 Mhz-NMR-Spektrum des Naturstoffs H_4
in $CDCl_3$; Varian-A-60-NMR-Spektrometer

Nach der Summenformel enthält die Verbindung H_4 zehn Doppelbindungsäquivalente. Sieben gehören den Umbelliferonanteil an. Die Zuordnung ergibt sich aus einem Verschiebungsvergleich mit in der Literatur beschriebenen Cumarinen und den Sesquiterpen-Umbelliferonethern H_1, H_3 und H_5.

Aus dem ^{13}C-NMR-Spektrum des Naturstoffs H_4 (Abb. 34) läßt sich entnehmen, daß der Sesquiterpenanteil gegenüber der Verbindung H_1 (2 Doppelbindungsäquivalente) 3 Doppelbindungsäquivalente enthält - ähnlich der Verbindung H_5. Das Singulett bei 132,0 ppm und das Dublett bei 128,74 ppm weisen auf die olefinische Doppelbindung (-C=CH-) hin, ähnlich wie bei dem Sesquiterpenanteil des H_5. Die Hydroxylgruppe der Substanz H_4 erscheint bei 78,88 ppm (H_1: C-3'-OH erscheint bei 75,6 ppm; H_5: C-3'-OH erscheint bei 75,9 ppm). Vergleiche im Bereich des Sesquiterpenanteils mit in der Literatur beschriebenen Diterpenen aus Cymbopogon proximus[2], Morithamnus crassus[7] und Chrysothamnus viscidiflorus[8] wie auch ^{13}C-NMR-Verschiebungen der Sesquiterpen-umbelliferonether H_1, H_3 und H_5 sprechen für eine trans-Orientierung der in C - 3' angeordneten Hydroxylgruppe.

Der Sesquiterpenanteil des H_4 besteht nach der Analyse der off-resonance-entkoppelten Aufnahme aus:

drei quartären C - Atomen
vier tertiären C - Atomen (davon ein CH-O)
vier sekundären C - Atomen (davon ein CH_2-O)
vier Methyl - C - Atomen.

Aus den chemischen ^{13}C-NMR-Verschiebungen hes H_4 im Vergleich zu Substanz H_5 und H_1 und Umbelliferon ist der endgültige Strukturvorschlag möglich (Abb. 36). Anhand dieser Konstitution lassen sich alle Verschiebungsänderungen des Cyclohexan-Cyclohexan-Rings erklären.

Das Massenspektrum von H_4 zeigt sein Molekularpeak bei M^+ 382 (Abb. 36).

Der Peak bei m/e 364 spricht für die Abspaltung eines Moleküls Wasser, und der Peak bei m/e 203 entsteht bei weiterer Spaltung des Umbelliferons. Die Fragmentierung wurde in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 6

m/e	Interpretation	%
382	M^+	30
364	$M - H_2O$	0,5
367	$M - CH_3$	0,5
349	$M - CH_3, -H_2O$	0,3
220	$M - C_9H_6O_3$	68
203	$M - C_9H_5O_3, -H_2O$	100
187	$M - CH_3, -H_2O, -C_9H_6O_3$	12
162	$M - C_{15}H_{24}O$	40

Ein plausibler Zerfallsweg für den Naturstoff H_3 ist in Schema 4 zusammengestellt.

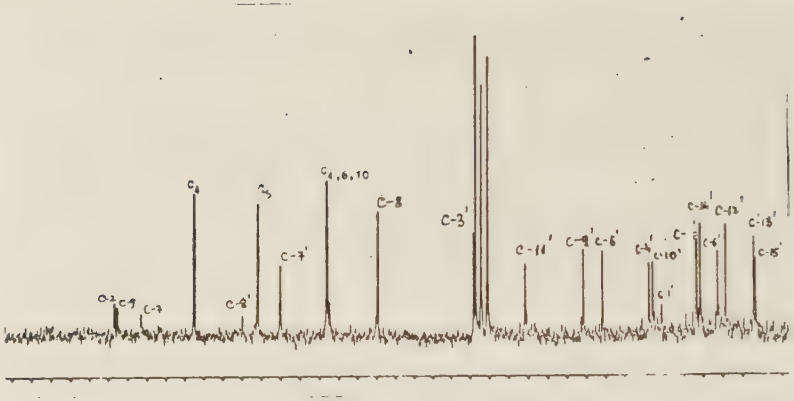


Abb. 34: ^{13}C-NMR-Spektrum des Naturstoffs H_4 in $CDCl_3$

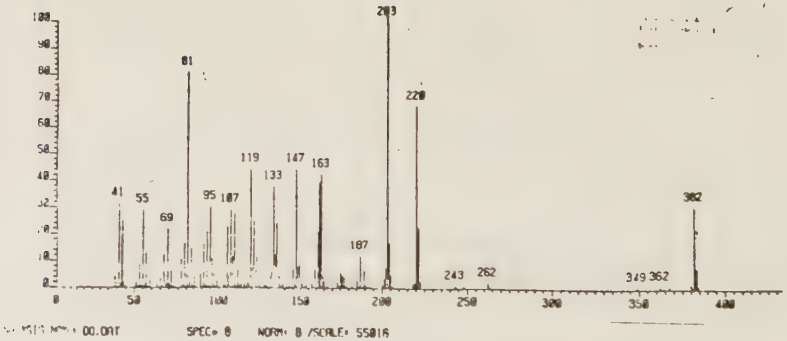


Abb. 35: MS des Naturstoffs H_4
Massenspektrometer der Fa. AEI, Typ MS 9
Ionenqu.-Temperatur 200°C
Elektronen-Energie 70 eV

Tabelle 5

Die chemischen Verschiebungen des ^{13}C-NMR-Spektrums des Naturstoffs H_4.

Zuordnung	H_4/ppm ($CDCl_3$)	Art der Gruppe
C - 2	162,01	-COO
C - 3	113,12	CH
C - 4	143,41	CH
C - 5	128,74	CH
C - 6	113,03	CH
C - 7	156,02	C-O-
C - 8	101,37	CH
C - 9	161,23	C-O-
C - 10	112,30	CH
C - 1'	35,68	CH_2
C - 2'	28,03	CH_2
C - 3'	78,88	CHO
C - 4'	38,71	C-
C - 5'	49,38	CH
C - 6'	23,28	CH_2
C - 7'	123,73	CH
C - 8'	131,51	C-
C - 9'	53,79	CH
C - 10'	37,85	C-
C - 11'	67,00	$-CH_2-O-$
C - 12'	21,55	$-CH_3$
C - 13'	15,25	$-CH_3$
C - 14'	27,85	$-CH_3$
C - 15'	14,85	$-CH_3$

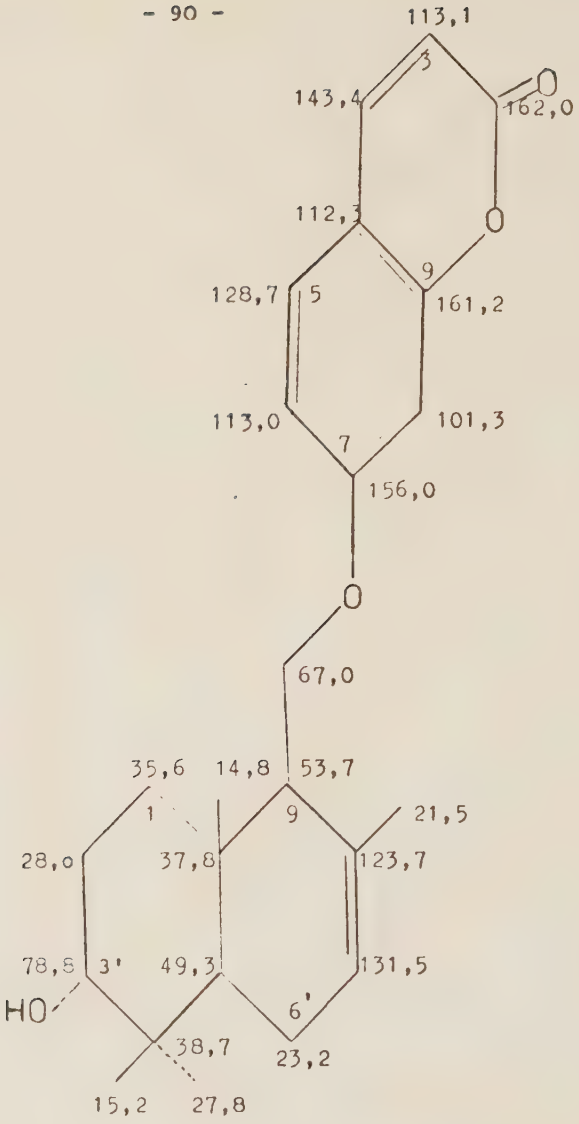
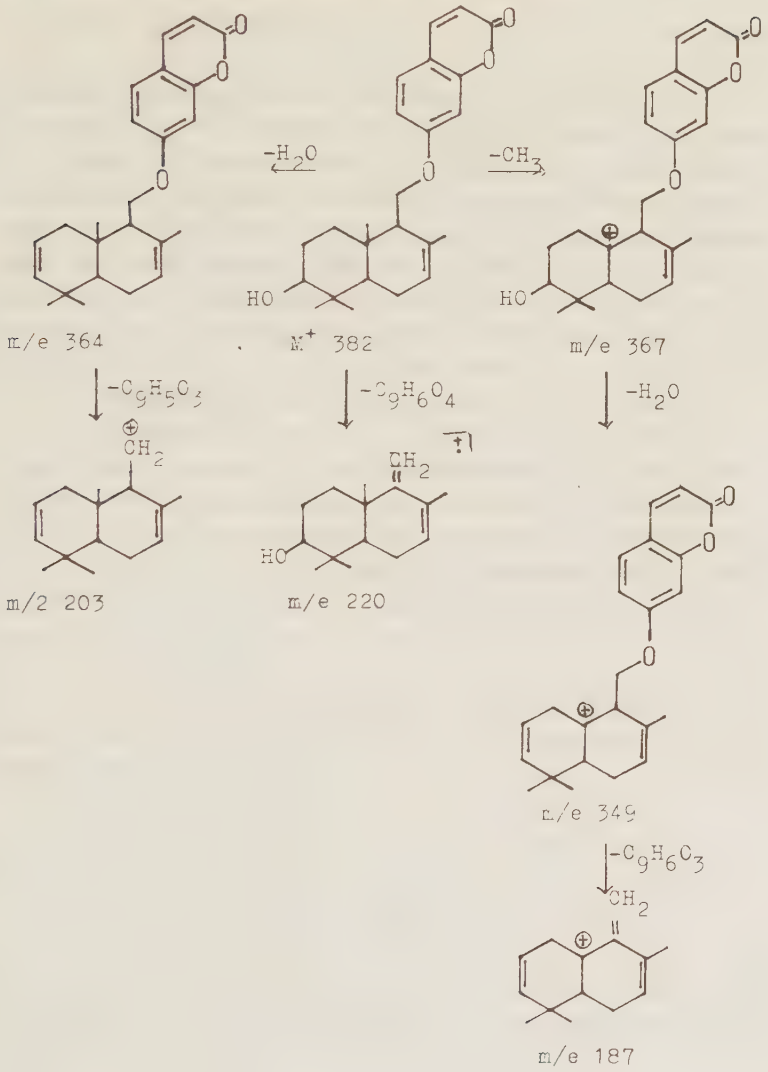


Abb. 36: ^{13}C-Signalzuordnung des Sesquiterpen-umbelliferon-ethers H_4

Schema 4:

Ein plausibler Zerfallsweg für den Naturstoff H_4



IX.2 Literatur

1. Anthonsen, T., McCabe, P. H., McCrindle, R. M. und Murray, R. D. H. Tetrahedron 25, 2233 (1969)
2. Locksley, H. D., Fayez, M. B. E., Radwan, A. S., Chari, V. M., Cordell, G. A. und Wagner, H., Planta med. 45, 20 (1982)
3. Caglioti, L., Naef, H., Arigoni, D. und Jeger, O., Helv. Chim. Acta. 41, 1717 (1958)
4. Caglioti, L., Naef, H., Arigoni, D. und Jeger, O., Helv. Chim. Acta. 41, 2278 (1958)
5. Bagirow, W. Yu., Khim. Prir. Soedin 652 (1978)
6. Golowina, L. A., Hasnow, T. H., Saidhodjaew, L. I., Malikow, W. M. und Rahmankylow, Y., Khim. Prir. Soedin. 566 (1978)
7. Bohlmann, F., Jakupovic, J., Robinson, H. und King, R. M., Phytochemistry 19, 2769 (1980)
8. Ngo Le-Van und Thi Van Cuong Pham, Phytochemistry 19, 1971 (1980)

XII.1

Isolierung und Strukturaufklärung von H_5

Gemahlenes Galbanum-Harz auch nach Vorextraktion mit Petrolether (30/50) und Diethylether, wobei auch kleine Mengen der Substanz H_5 extrahierbar sind, mit Dichlormethan extrahiert. Der filtrierte Extrakt wurde zum Sirup eingeengt; etwa 2 gr. davon wurden auf Kieselgel, feiner als 230 mesh, aufgebracht und im Vacuum bei etwa 35° C eingetrocknet. Als stationäre Phase für die Säulenchromatographie diente Kieselgel 60, feiner als 230 mesh, als mobile Phase Chloroform/Methanol 98 + 2 (V/V). Vorbereitung und Trennung auf der Säule wie Seite 60.

Die Elution wurde mit einer mobilen UV-Lampe (365 nm) beobachtet. Die Fraktionen, die die Substanz H_5 enthalten, wurden dc untersucht, anschließend vereinigt und im Vacuum bei 35° C eingeengt. Die weiße bis gelbliche Substanz wurde wieder in wenig Dichlormethan/Diethylether (1 + 2) aufgenommen und in Dunkel stehen gelassen.

Die isolierten, weißen bis schwach gelblichen Kristalle haben einen Schmelzpunkt von 52/53° C und zeigen einen Molekularpeak bei M^+ 382.

Nach der Elementaranalyse handelt es sich um $C_{24}H_{30}O_4$

$MG_{ber.}$ 382,47; $C_{ber.}$ 75,41 %; $H_{ber.}$ 7,9 %
$C_{gef.}$ 75,30 %; $H_{gef.}$ 7,8 %.

Das UV-Spektrum in methanolischer Lösung zeigt eine starke Absorption bei 324 nm und ist dem des Sesquiterpen-umbelliferonethers H_1 ähnlich.

Das IR-Spektrum des Naturstoffs H_5 (Abb. 37) zeigt charakteristische Absorptionsbanden bei 1725 cm^{-1} (γ-Pyrone),

1610, 1510, 825 cm^{-1}, die für ein substituiertes Umbelliferon sprechen.

Die Banden bei etwa 1200 und 1155 cm^{-1} sind ein Hinweis auf mehrere Methylgruppen an einem gemeinsamen Kohlenstoffatom. Die Absorption bei 1285/1160 und 1130 cm^{-1} (=C-O-C-Valenzschwingung weist auf einen asymmetrischen aromatischen Ether hin. OH-Valenzschwingungen bei etwa 3470 cm^{-1} sind einer freien Hydroxylgruppe zuzuordnen.

Die diskutierten UV- und IR-Daten sowie Vergleiche von ^{1}H-NMR-Messungen mit in der Literatur beschriebenen Diterpenen aus Acritopappus-Species[10] und Solidago canadensis L.[11] sprechen für eine ähnliche Struktur des Sesquiterpenanteils des Naturstoffs H_5[1-12].

Aus der großen Ähnlichkeit des ^{1}H-NMR-Spektrum des Sesquiterpen-umbelliferonethers H_1 und der Verbindung H_5 (Abb. 38) läßt sich entnehmen, daß ein an O-7 mit einem ungesättigten Sesquiterpenalkohol substituiertes Umbelliferon vorliegt.

Im Bereich von 7,64 - 6,24 ppm treten die bekannten Signale für den Umbelliferonanteil auf. Die neuen Signale, das Dublett bei 5,47 ppm, sind mit der Änderung in der Struktur des Sesquiterpenanteils zwischen C - 7' und C - 8' in Verbindung zu bringen und den Verschiebungen des Protons H - 7' zuzuordnen. Dafür sprechen auch die ^{13}C-NMR-Messungen. Die beiden Methylgruppen in C - 4' Stellung erscheinen bei 0,97 und 0,95 ppm. Die dritte Methylgruppe in der C - 10' Stellung tritt als Singulett bei 0,86 ppm auf. Eine vierte Methylgruppe in der C - 8' Stellung erscheint als Singulett bei 1,01 ppm. Zwischen 4,0 - 4,15 ppm treten die Signale des $C\text{-}CH_2\text{-}O$ auf. Das OH-Proton des C - 3' shiftet in den Bereich um 3,47 ppm.

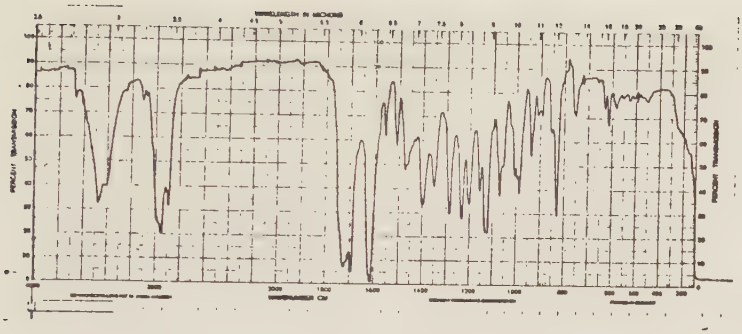


Abb. 37: IR-Spektrum des Naturstoffs H_5
KBr-Preßling, Bekcman -Photometer IR-20 AX

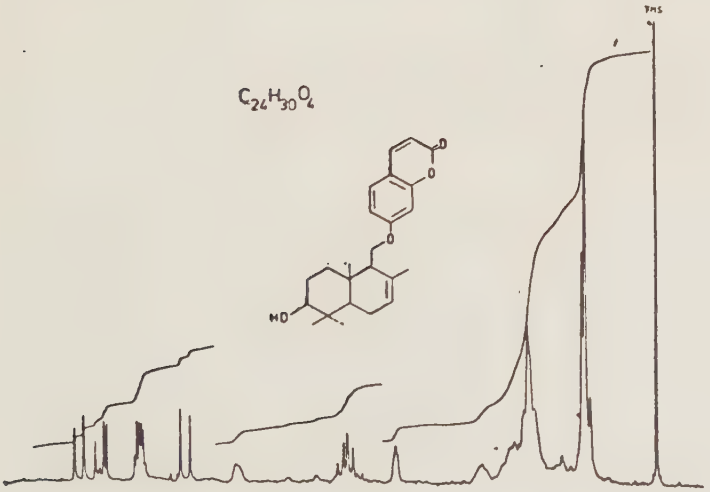


Abb. 38: 60 MHz-NMR-Spektrum des Naturstoffs H_5
in $CDCl_3$; Varian-A-60-NMR-Spektrometer

Nach der Summenformel enthält die Verbindung H_5 zehn Doppelbindungsäquivalente. Von diesen gehören sieben zu dem Umbelliferonanteil, wie aus den Signalen zwischen 101,5 - 162,3 ppm hervorgeht.

Die vorgeschlagene Struktur (Abb. 41) wird durch die Interpretation des ^{13}C-NMR-Spektrums (Abb. 39) und den Vergleich mit Verschiebungen im Bereich des Sesquiterpenanteils der Substanzen H_1, H_3, H_4, sowie auch in der Literatur beschriebenen Diterpenen aus Morithamnus crassus[1], Chrysothamnus viscidiflorus[2], Trochocoleopsis sacculata[3], Pellia endiviaefolia[3] und Cymbopogon proximus[4] bestätigt.

Der Sesquiterpenanteil des H_5 besteht nach der Analyse der off-resonance-entkoppelten Aufnahme aus:

drei quartären C - Atomen
vier tertiären C - Atomen (davon ein CH-O-)
vier sekundären C - Atomen (davon ein CH_2-O-)
vier Methyl - C - Atomen

Das Singulett bei 132,7 ppm und das Dublett bei 124,0 ppm weisen auf eine neu eingeführte Doppelbindung in dem Sesquiterpenanteil (Vergleich mit H_1) hin. Die Unterscheidung zwischen C - 4' und C - 6' ergibt sich aus dem Fehlen einer m-Kopplung für das Signal bei 113,3 ppm im Gegensatz zu 113,2 ppm. Aus den chemischen ^{13}C-NMR-Verschiebungen des H_5 im Vergleich zu H_1 und Umbelliferon ist der endgültige Strukturvorschlag möglich. Anhand dieser Konstitution lassen sich alle Verschiebungsänderungen des Cycohexan-Cyclohexan-Rings erklären.

Das Massenspektrum des Sesquiterpen-umbelliferonethers H_5 (Abb. 40) zeigt einen Molekularpeak bei M^+ 382.

Der Peak bei m/e 364 spricht für die Abspaltung eines Moleküls Wasser, und der Peak bei m/e 349 entsteht bei weiterer Abspaltung einer Methylgruppe. Der Basispeak bei m/e 203 spricht für die Abspaltung des Umbelliferons und eines Wassermoleküls. Der Peak bei m/e 221 entsteht bei der Abspaltung des Umbelliferons. Das bei der Elektronenanlagerung gegildete Molekülion stabilisiert sich durch die Abspaltung eines Protons und bildet somit das Molekülion m/e 220.

Die Fragementierung wurde in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8

m/e	Interpretation	%
382	M^+	10
364	$M - H_2O$	0,5
349	$M - H_2O, -CH_3$	0,2
221	$M - C_9H_5O_3$	13
220	$M - C_9H_5O_3 + H$	43
203	$M - C_9H_5O_3, -H_2O$	100
187	$M - H_2O, -CH_3, -C_9H_6O_3$	8
162	$M - C_{15}H_{26}O$	22

Ein plausibler Zerfallsweg für den Naturstoff H_5 ist in Schema 5 zusammengestellt.

Tabelle 7

Die chemischen Verschiebungen des ^{13}C-NMR-Spektrums der Sesquiterpen-umbelliferonethers H_5 und H_1

Zuordnung	H_5/ppm ($CDCl_3$)	Art der Gruppen	H_1/ppm ($CDCl_3$)	Art der Gruppen
C - 2	162,3	-COO	162,0	-COO
C - 3	113,3	CH	113,3	CH
C - 4	143,5	CH	143,5	CH
C - 5	128,8	CH	128,8	CH
C - 6	113,1	CH	113,2	CH
C - 7	156,2	CO	156,0	CO
C - 8	101,5	CH	101,7	CH
C - 9	161,4	CO	161,4	CO
C - 10	112,6	C-	112,7	C-
C - 1'	31,9	$-CH_2-$	32,9	$-CH_2-$
C - 2'	25,2	$-CH_2-$	25,2	$-CH_2-$
C - 3'	75,9	CHO	75,6	CHO
C - 4'	37,3	C-	38,0	C-
C - 5'	43,5	CH	48,5	CH
C - 6'	23,3	$-CH_2-$	20,0	$-CH_2-$
C - 7'	124,0	CH (S)[x]	44,2	$-CH_2-$ (T)[x]
C - 8'	132,7	C- (D)[x]	72,7	CO (S)[x]
C - 9'	53,7	CH	59,4	CH
C - 10'	35,7	C-	37,5	C-
C - 11'	67,2	$-CH_2-O$	66,7	$-CH_2-O$
C - 12'	21,7	$-CH_3$	24,7	$-CH_3$
C - 13'	28,1	$-CH_3$	28,5	$-CH_3$
C - 14'	22,4	$-CH_3$	22,1	$-CH_3$
C - 15'	14,8	$-CH_3$	16,0	$-CH_3$

x) Off-resonance-Multiplizität

S = Singulett

T = Triplett

D = Dublett

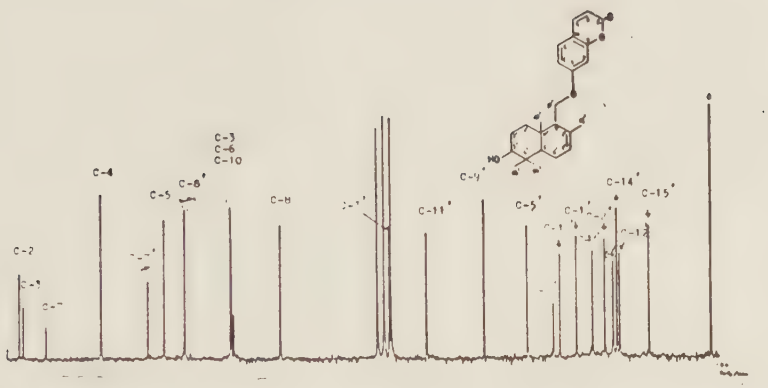


Abb. 39: ^{13}C-NMR-Spektrum des Naturstoffs H_5 in $CDCl_3$; Bruker WP-80-Fourier-NMR-Spektrometer; 20115 MHz für ^{13}C; 8000 MHz für ^{1}H-Entkopplung.

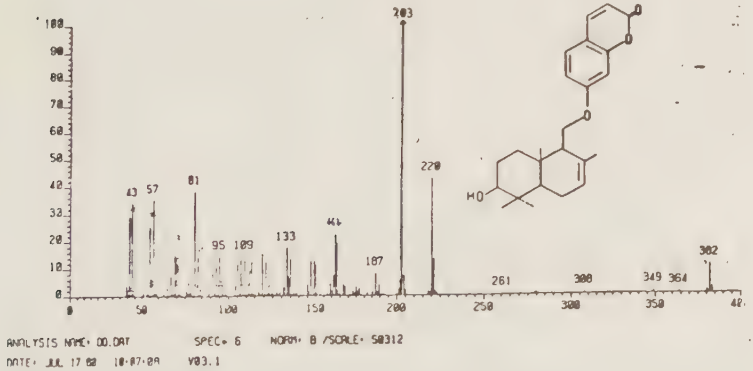


Abb. 40: MS des Naturstoffs H_5
Massenspektrometer der Fa. AEI, Typ MS 9
Ionenqu.-Temperatur 200°C
Elektronen-Energie 70 eV

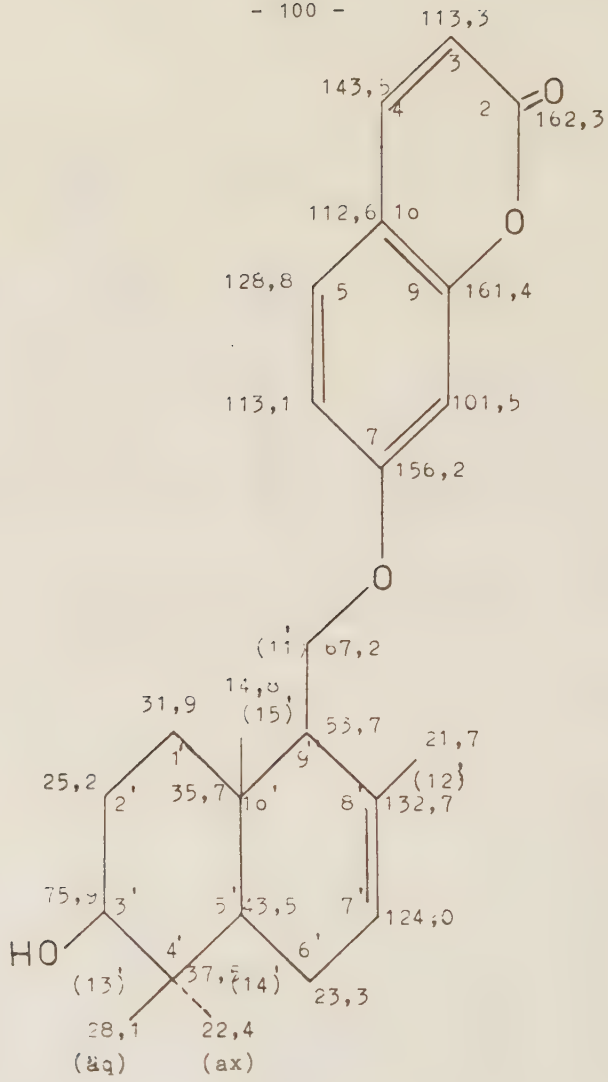
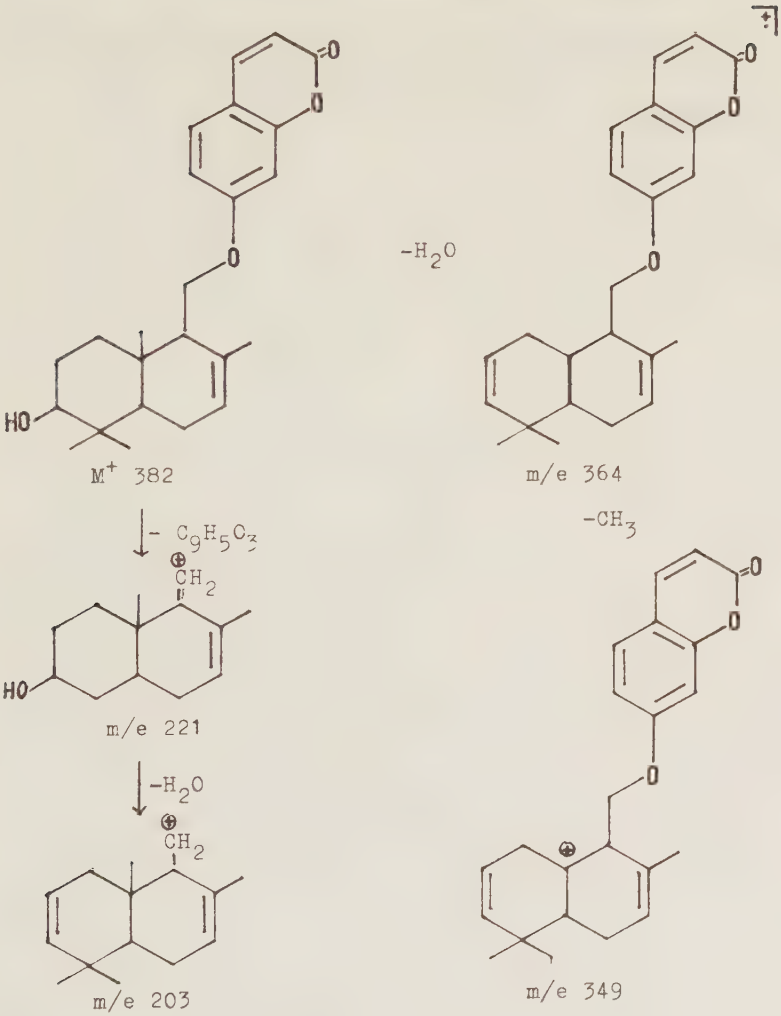


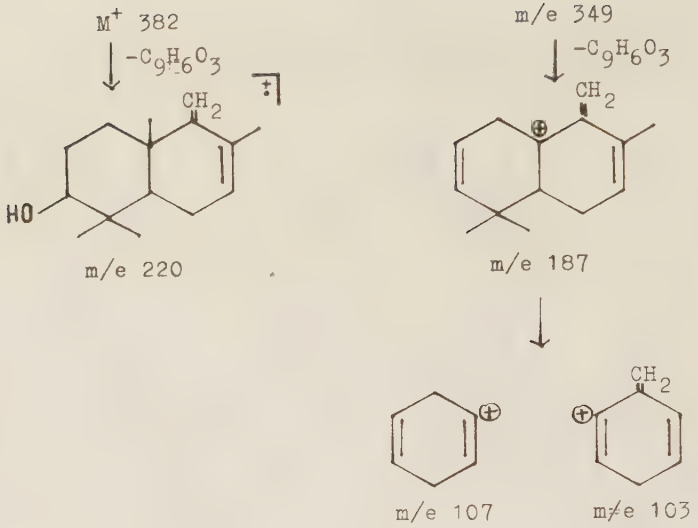
Abb. 41: ^{13}C-Signalzuordnung des Sesquiterpen-umbelliferonethers H_5[x]

x) Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Breitmaier für die freundliche Aufnahme und Interpretation dieser Spektren.

Schema 5:

Ein plausibler Zerfallsweg für den Naturstoff H_5.




M+ 382
-C9H6O3
CH2
HO
m/e 220
m/e 349
-C9H6O3
CH2
m/e 187
CH2
m/e 107
m/e 103

XII.2

Literatur

1. Bohlmann, F., Jakupovic, J., Robinson, H., und King, R. M., Phytochemistry 19, 2679 (1980)
2. Ngo Le-Van und Thi Van Cuong Pham, Phytochemistry 19, 1971 (1980)
3. Asakawa, Y., Toyota, M. und Takemoto, T., Phytochemistry 19, 1799 (1980)
4. Locksley, H. D., Fayez, M. B. E., Radwan, A. S., Chari, V. M., Cordell, V. M. und Wagner, H., Planta med. 45, 20 (1982)
5. Sakakibara, I., Okuyama, T. und Shibata, S., Planta med. 44, 199 (1982)
6. Kulkarni, M. V., Pujar, B. G. und Patil, V. D., Arch. Pharm. (Weinheim) 316, 15, (1983)
7. Bohlmann, F., Fritz, U., King, R. M. und Robinson, H., Phytochemistry 19, 2655 (1980)
8. Perelson, M. E., Sokolowa, A. I. und Sklear, Yu. E., Khim. Prir. Soedin. 318, (1978)
9. Golowina, L. A., Hasanow, T. H., Saidhodjaew, Khim. Prir. Soedin. 566, (1978)
10. Bohlmann, F., Zdero, C., Gupta, R. K., King, R. M. und Robinson, H., Phytochemistry 19, 2695 (1980)
11. T. Anthonsen, T., McCabe, P. H., McCrindle, R. und Murray, R. D. H., Tetrahedron 25, 2233 (1969)
12. Caglioti, L., Naef, H., Arigoni, D. und Jeger, O., Helv. Chim. Acta. 41, 2278 (1958).

XIII.1
Isolierung und Strukturaufklärung von H_7

Zur Isolierung des Naturstoffs H_7 wurde gemahlenes Galbanum-Harz mit Petrolether gewaschen und anschließend mit Dichlormethan extrahiert. Der filtrierte Extrakt wurde bis zur Sirupdicke eingeengt: etwa 2 gr. davon wurden auf Kieselgel, feiner als 230 mesh aufgebracht und im Vacuum bei 35° C getrocknet. Als stationäre Phase für die Säulenchromatographie diente Kieselgel 60, feiner als 230 mesh. Als mobile Phase diente zunächst n-Hexan/Ethylacetat 80 + 20. Für die Vorbereitung der Säule gilt die Beschreibung von Seite 60.

Die Elution wurde mit einer mobilen UV-Lampe (365 nm) im Dunkeln kontrolliert. Die Substanz H_7 fluoresziert hellblau.

n-Hexan/Ethylacetat diente dazu, Bestandteile zu entfernen, die bei Elution mit Chloroform/Methanol 98 + 2 nicht vom H_7 zu trennen sind. Nachdem sich H_7 etwa in der Mitte der Säule befand, wurde die Elution mit Chloroform/Methanol weitergeführt. Die Fraktionen, die die Substanz H_7 enthielten, wurden vereinigt und im Vacuum bei etwa 35° C eingeengt. Diese gelbliche Substanz wurde weiter mittels präparativer Schicht-Chromatographie gereinigt. Dazu diente als mobile Phase Chloroform/Methanol 96 + 4. Die stark im UV-Licht bei 365 nm fluoreszierende Substanz wurde nach der Entwicklung markiert, auf übliche Weise mit Dichlormethan eluiert, die Lösung abfiltriert, eingeengt und zur Kristallisation stehen gelassen. Die isolierten weißen, nadelförmigen Kristalle haben einen Schmelzpunkt von 157° C und zeigen einen Molekularpeak bei M^+ 380.

Nach der Elementaranalyse handelt es sich um $C_{24}H_{28}O_4$:
$MG_{ber.}$ 380,489; $C_{ber.}$ 75,76 %; $H_{ber.}$ 7,41 %; $O_{ber.}$ 16,82 %;
$C_{gef.}$ 75,66 %; $H_{gef.}$ 7,39

Das UV-Spektrum zeigt in methanolischer Lösung eine starke Absorption bei etwa 324 nm und ist dem des Umbelliferons ähnlich.

In dem IR-Spektrum des Naturstoffs H_7 (Abb. 42) sind alle charakteristischen Absorptionsbanden des Umbelliferonanteils bei 1730 (γ-Pyrone), 1615, 1510 und 830 cm^{-1} vorhanden.

Für die zwei an C - 4' gebundenen Methylgruppen gibt es entsprechend zwei Absorptionsbanden bei etwa 1195 und 1155 cm^{-1}, die charakteristisch für den Teil Sesquiterpen sind. Für einen asymmetrischen aromatischen Ether sprechen scharfe Absorptionsbanden bei etwa 1280 - 1155 und 1120 cm^{-1} (=C-O-C-). In der Carbonylregion ist bei 1670 cm^{-1} eine scharfe Absorptionsbande, die sich einer C = O Valenzschwingung des Sesquiterpenanteils zuordnen läßt (α, ß ungesättigtes Keton).

Aus den diskutierten UV-, IR-Daten und ^{1}H-NMR-Vergleichen zwischen H_1, H_4, H_5 und H_7 (Abb. 43) läßt sich aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum entnehmen, daß ein an 7 - O mit einem Sesquiterpenalkohol substituiertes Umbelliferon vorliegt. Die zwei Methylgruppen in C - 4' Stellung lassen sich im Bereich von 1,09 und 1,13 ppm erkennen.

Alle bekannten Signale des Umbelliferonanteils zwischen 7,69 - 6,19 ppm sind vorhanden.

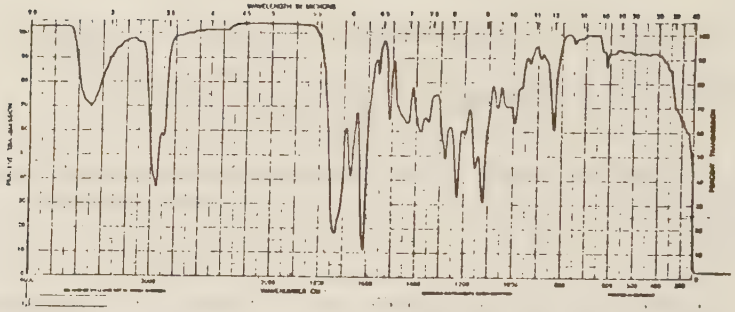


Abb. 42: IR-Spektrum des Naturstoffs H_7
KBr-Preßling, Beckman -Photometer IR-20 AX

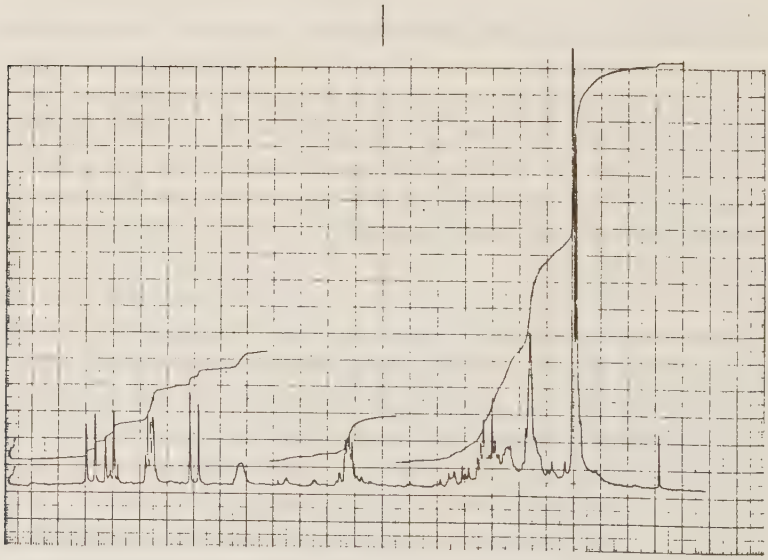


Abb. 43: 60 MHz-NMR-Spektrum des Naturstoffs H_7
in $CDCl_3$; Varian-A-60-NMR-Spektrometer

Für den Sesquiterpenanteil der Verbindung H_7 ist kein OH-Proton im Bereich um 3,4 ppm erschienen wie bei den Sesquiterpen-umbelliferonethern H_1, H_3, H_4 und H_5.

Das breite Signal bei 5,61 ppm ist den Verschiebungen des α-Vinyl-Protons H - 7' zuzuordnen. Ähnlich wie bei dem Sesquiterpen-umbelliferonether H_3 beeinflußt auch hier die Carbonylgruppe die Verschiebungen. Bei den Sesquiterpen-umbelliferonethern H_4 und H_5 shiften diese Signale um 5,46 - 5,47 ppm. Jedoch bei der Substanz H_3, wo auch eine Carbonylgruppe im Sesquiterpenanteil vorhanden ist, sind starke Verschiebungen nachzuweisen. Vergleich mit in der Literatur beschriebenen Diterpenen ähnlicher Struktur wie Methyl-6-oxo-7-labden-15-oat, wo das Signal für H - 7' auch bei 5,61 ppm erscheint, wie auch die ^{1}H-NMR-Messungen der Sesquiterpen-umbelliferonether H_1, H_3, H_4 und H_5 und deren Fragmentierungen sprechen für die Einordnung der Carbonylgruppe in C' - 6 Stellung[1-10].

Das Massenspektrum des Naturstoffs H_7 zeigt einen Molekularpeak bei M^+ 380 (Abb. 44).

Der Peak bei m/e 365 deutet auf die Abspaltung einer Methylgruppe hin. Der Peak bei m/e 219 entsteht durch Abspaltung des Umbelliferons. Das bei der Elektronenlagerung gebildete Molekülion m/e 219 stabilisiert sich durch Abspaltung eines Protons und bildet somit das Molekülion m/e 218. Die Peaks bei 162 (Umbelliferon), 121, 107, 93 und 79 entstehen bei der Umbelliferonfragmentierung.

Die Fragmentierung wurde in Tabelle 9 zusammengestellt.

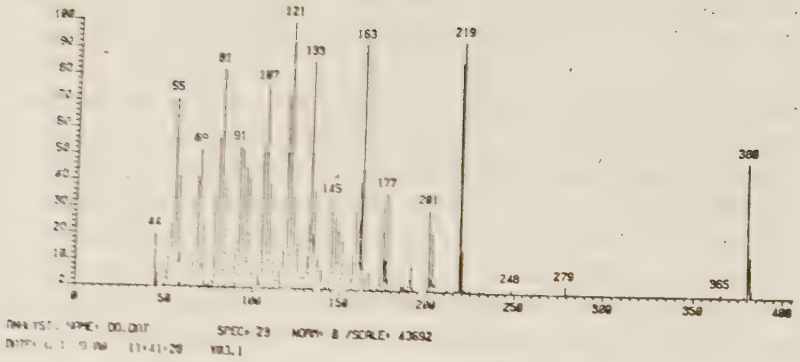


Abb. 44: MS des Naturstoffs H_7
Massenspektrometer der Fa. AEI, Typ MS 9
Ionenqu.-Temperatur 200°C
Elektronen-Energie 70 eV

Tabelle 9

m/e	Interpretation	%
380	M^+	50
365	$M - CH_3$	0,5
219	$M - C_9H_5O_3$	93
218	$M - C_9H_5O_3$;-H	85
191	$M - C_9H_5O_3$;-CO	9
162	$M - C_{15}H_{22}O$	40

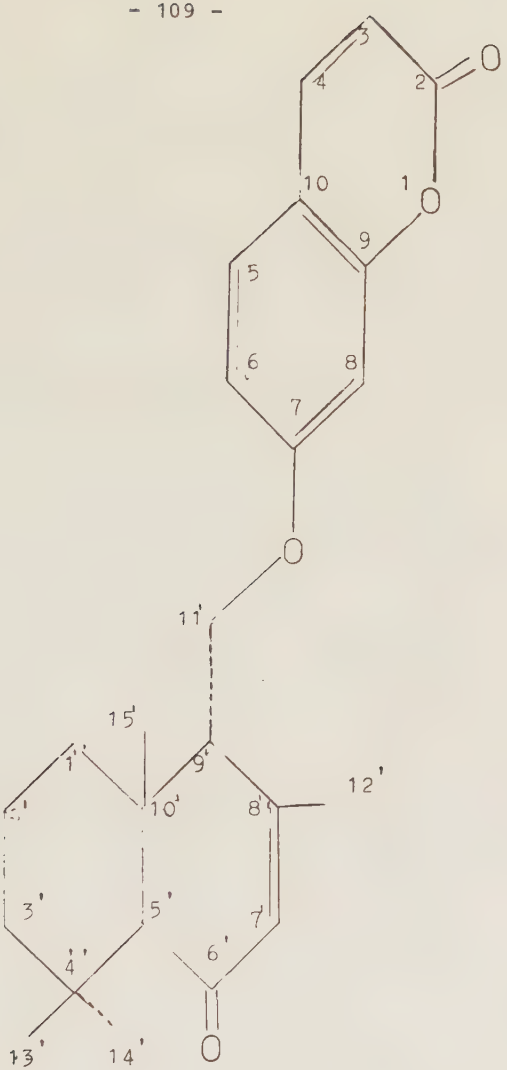
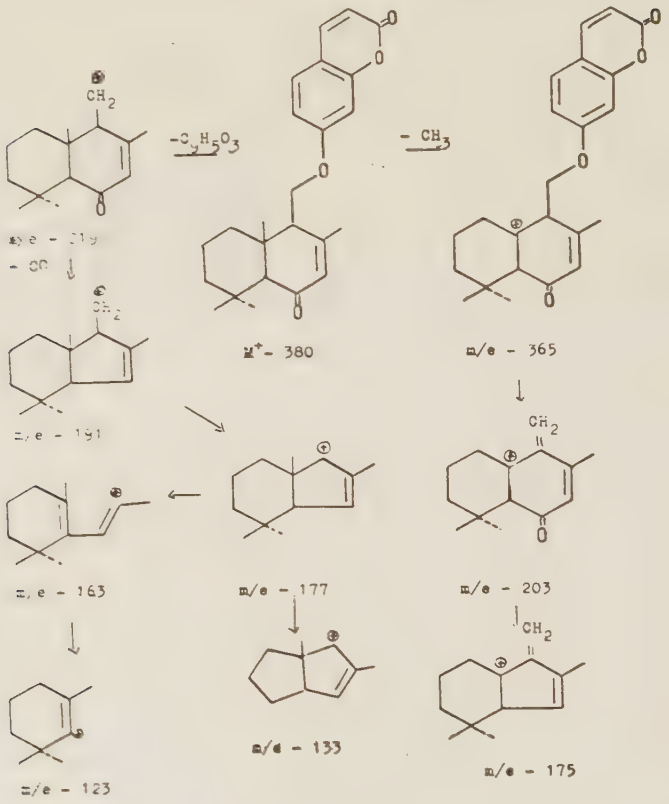


Abb. 45: H_7 - $C_{24}H_{28}O_4$ Strukturvorschlag

Schema 6:
Ein plausibler Zerfallsweg für den Naturstoff H_7.



XIII.2 Literatur

1. Anthonsen, T., McCabe, P. H., McCrindle, R. und Murray, R. D. H. Tetrahedron 25, 2233 (1969)
2. Caglioti, L., Naef, H., Arigoni, D. und Jeger, O., Helv. Chim. Acta 243, 2278 (1958)
3. Pinto, A. C., Silva, A. J. R., Mayer, L. M. U. und Braz, R., Phytochemistry 18, 2036 (1979)
4. Rodriguez, B. und Savona, G., Phytochemistry 19, 1805 (1980)
5. Bohlmann, F. und Knoll, K.-H., Phytochemistry 18, 995 (1979)
6. Akasawa, Y., Toyota, M. und Takemoto, T., Phytochemistry 19, 1799 (1980)
7. Bohlmann, F., Jakupovic, J., Robinson, H. und King, R. M., Phytochemistry 19, 2769 (1980)
8. Ngo Le-Van und Thi Van Cuong Pham, Phytochemistry 19, 1971 (1980)
9. Savona, G., Piozzi, F., Bruno, M. und Rodriguez, B., Phytochemistry 21, 2699 (1982)
10. J. de Pascual-T., Bellido, I. S., Basabe, P., Marcos, I. S., Ruano, L. F. und Urones, J. G., Phytochemistry 21, 899 (1982)

XVI.1 Isolierung und Strukturaufklärung der Sesquiterpenester

Das gemahlene Galbanum-Harz wird je dreimal mit n-Hexan, n-Heptan und Petrolether (30/50) zwei Stunden lang unter Magnetrührung extrahiert. Die Dekantate werden abfiltriert und im Vacuum bei 30° C eingeengt. Es werden hellgelbe, ölige Fraktionen gewonnen. Die HPLC-DC-Kopplung zeigt, daß in den Hexan- und Heptan-Extrakten kaum Sesquiterpen-umbelliferonether vorhanden sind, im Petrolether-Extrakt sind aber die Verbindungen H_7 und H_5 nachweisbar. Die eingeengten Extrakte werden je in 50 ml n-Heptan aufgenommen und 24 Stunden auf -18° C gekühlt. Durch Filtration im Kühlraum werden die ausgefallenen Niederschläge abgetrennt. Die n-Heptan-Filtrate werden vereinigt und im Vacuum bei 30° C eingeengt. Etwa 1 gr. eingeengter Extrakt wird in 5 ml Dichlormethan aufgenommen, auf Kieselgel, feiner als 230 mesh, aufgesaugt und weiter im Vacuum getrocknet. Als stationäre Phase für die Säulenchromatographie dient Kieselgel Si-60, feiner als 230 mesh. Als mobile Phase dienen n-Hexan + Ethylacetat (70 + 30). Die Trennung mittels DC und HPLC wird mit einer mobilen UV-Lampe (bei 360 nm) beobachtet. Die Fraktionen, die laut DC und HPLC einheitliche Verbindungen enthalten, werden vereinigt und im Vacuum bei 30° C eingeengt. Die Fraktionen, die nicht einheitlich sind, werden für die Gewinnung der Verbindungen S_2 und S_3 mittels präparativer Schicht-Chromatographie (PSC) gebraucht. Als mobile Phase dienen Chloroform + Methanol (98 + 2). Nach Entwicklung der präparativen Chromatogramme im UV-254 nm und 360 nm werden die absorbierenden Zonen markiert (in beiden Wellenlängen ist die Absorption sehr schwach) und weiter auf die übliche Weise mit Dichlormethan/Ethylacetat (1 + 1) eluiert, abfiltriert, eingeengt und zur Kristallisation gebracht. Es wird unter Lichtschutz gearbei-

tet. Die Extrakte sind lichtempfindlich und werden binnen 48 Stunden grünlich; nach mehreren Tagen werden sie dunkelgrün bis grünbraun und schließlich dunkelbraun. Wenn die Extrakte bei -18° C lichtgeschützt aufbewahrt werden, verlaufen diese Farbänderungen langsamer.

Für die Gewinnung der Substanz S_4 wird die Extraktion des Galbanum-Harzes mit Diethylether durchgeführt. Der Extrakt wird bei 30° C im Vacuum vom Lösungsmittel befreit, in n-Hexan aufgenommen, bei -18° C 48 Stunden gekühlt. Der in n-Hexan ungelöste Teil wird zweimal kalt mit n-Heptan gewaschen, in wenigen ml Dichlormethan aufgenommen, auf Kieselgel, feiner als 230 mesh, aufgesaugt und im Vacuum bei 30° C getrocknet. Die Trennung durch Säulenchromatographie erfolgt unter den gleichen Bedingungen, wie oben beschrieben. Als mobile Phase dient Chloroform + Methanol (98 + 2).

Alle gewonnen Verbindungen haben im kurz- oder langwelligen UV-Licht keine Eigenabsorption. Sie wurden mittels Anisaldehyd-Schwefelsäure (Stahls Reagenz für terpenoide Verbindungen) und Erhitzen auf 110° C zur Fluoreszenz angeregt. Die Verbindungen S_1, S_2, S_3 und S_4 fluoreszieren im UV-Licht bei 365 nm hellgrün, im Tageslicht zeigen ~~sich~~ alle eine kräftige Violettfarbe (Abb. 3, S. - 14).

XV.1 Isolierung und Strukturaufklärung des Sesquiterpenesters S_1

Zur Isolierung wurde gemahlenes Galbanum-Harz mit n-Heptan extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vacuum bei 30° C wurde 1 gr. Extrakt in 5 ml Dichlormethan aufgenommen und auf Kieselgel Si 60, feiner als 230 mesh, aufgesaugt. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vacuum (30° C) wurde das imprägnierte Kieselgel auf die vorbereitete Säule gebracht (stationäre Phase Kieselgel Si 60, feiner als 230 mesh; mobile Phase n-Hexan/Ethylacetat (85 + 15). Die Fraktionen, die die Verbindung S_1 enthielten (DC), wurden vereinigt und im Vacuum bei 30° C eingeengt. Die Substanz konnte nicht kristallin gewonnen werden. Die ölige Substanz zeigt einen Molekularpeak bei M^+ 378. Nach der Elementaranalyse handelt es sich um $C_{22}H_{34}O_5$, $MG_{ber.}$ 378,477; $C_{ber.}$ 69,81 %; $H_{ber.}$ 9,04 %; $C_{gef.}$ 69,77 %; $H_{gef.}$ 8,89 %.

Das IR-Spektrum (Abb. 46) der Verbindung S_1 zeigt zwei Absorpitonsbanden in der Carbonylregion bei 1750 und 1725 cm^{-1}, die den Carbonylgruppen der Angelica- und Essigsäure zuzuordnen sind. Vorhanden ist auch die Doppelbindung, die auch im IR-Spektrum der Substanz S_2 bei 1650 cm^{-1} erschienen ist und für den ungesättigten Teil der C_5 - Säure spricht. Weitere Valenzschwingungen, die im Angelicasäureanteil zuzuordnen sind, erscheinen bei 1150, 1240 und 1375 cm^{-1}. Eine freie Hydroxylgruppe ist bei 3440 cm^{-1} vorhanden.

Die ^{13}C-NMR-Messungen bestätigen die Annahme, daß ein Sesquiterpenester, ähnlich der Verbindung S_2 und S_4, vorliegt.

Nach der Summenformel enthält die Verbindung S_1 sechs Doppelbindungsäquivalente. Von diesen gehören drei den Carbonylgruppen der Essig- und Angelicasäure (170,13 und 176,0 ppm) bzw. der Doppelbindung der Angelicasäure (139,12 und

128,86 ppm) an. Die olefinische Doppelbindung (128,13 und 131,81 ppm) ist zwischen C - 6 und C - 7 einzuordnen. Die vorhandende Polarisierung des Angelicasäurerestes und das Vorhandensein eines Konjugationseffektes auf die Carboxyl-Kohlenstoffatome (167,0 ppm) sprechen für einen α, ß-ungesättigten Ester. Aus den off-resonance-Multiplizitäten sowie mit Hilfe der gegebenen Verschiebungen des Sesquiterpens S_1 und durch Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Verbindungen 1α-Angeloyloxy-6α-hydroxy-9-oxo-carot-en[1] und 8α-Tiglinoyloxycumambranolid[2] und den isolierten Verbindungen S_2 und S_4 (aus Galbanum-Harz) sowie mit den gegebenen Verschiebungen Cyclohepten-Cyclopenten gelingt die in Abb. 48 aufgezeichnete Konstitution.

Das Massenspektrum der Verbindung S_1 zeigt einen Molekularpeak bei M^+ 378 (Abb. 47). Das erste Folgefragment bei m/e 278 deutet auf die Abspaltung von Angelicasäure wie bei der Verbindung S_4. Das Fragment bei m/e 218 deutet auf die Abspaltung von Essigsäure wie bei der Verbindung S_2. Die Fragmente bei m/e 203 und 175 sprechen im Zusammenhang mit den Peaks m/e 83, 55 und 43 für das Vorliegen eines Sesquiterpenesters mit einer ungesättigten C_5-Säure und Essigsäure. Die Spaltprodukte bei m/e 278, 83 und 55 sind typisch für einen Angelica- oder Tiglinsäureester. Das Fragment bei m/e 218 entsteht durch Eliminierung von Angelicasäure, gefolgt von der Eliminierung von Essigsäure. Das Fragment bei m/e 279 entsteht durch die Abspaltung der $CH_3CH\text{-}C(CH_3)COO^-$ Gruppe. Das gebildete Molekülion stabilisiert sich durch Eliminierung eines Protons und bildet damit den Peak bei m/e 278 (metastabil). Durch Abspaltung der Acetylgruppe CH_3COO^- erscheint ein Peak bei m/e 219. Das gebildete Molekülion stabilisiert sich durch Abspaltung eines Protons mit der Bildung des Signals bei m/e 218.

Das vorliegende Fragment bei m/e 43 (CH_3COO^- - CO) deutet auf Vorhandensein der Acetylgruppe. Der Peak bei m/e 236 entsteht durch Abspaltung der Isopropylgruppe. Diese Spaltprodukte wie auch Vergleiche mit den von uns isolierten Sesquiterpenestern S_2/S_4 und anderen in der Literatur beschriebenen Sesquiterpenestern mit Angelica- und Essigsäure[1,3,4,5] lassen schlußfolgern, daß es sich bei dieser Verbindung um einen Angelica- und Essigsäure-sesquiterpenester vom Guajan-Typ handelt.

Die Fragmentierung wurde in Tabelle 10 zusammengestellt:

Tabelle 10

m/e	Interpretation
378	M^+
319	$M - CH_3COO^-$
318	$M - CH_3COOH$
279	$M - CH_3CH{=}CCH_3COO^-$
278	$M - CH_3CH{=}CCH_3COOH$
263	$M - CH_3CH{=}CCH_3COOH; -CH_3$
236	$M - CH_3CH{=}CCH_3COOH; -C_3H_6$
218	$M - CH_3CH{=}CCH_3COOH; -CH_3COOH$
175	$M - CH_3CH{=}CCH_3COOH; -CH_3COOH; -(CH_3)_2CH^+$
99	$CH_3CH{=}CCH_3COO^-$
83	$CH_3CH{=}CCH_3CO^-$
53	$CH_3CH{=}CCH_3^+$
43	CH_3CO^-

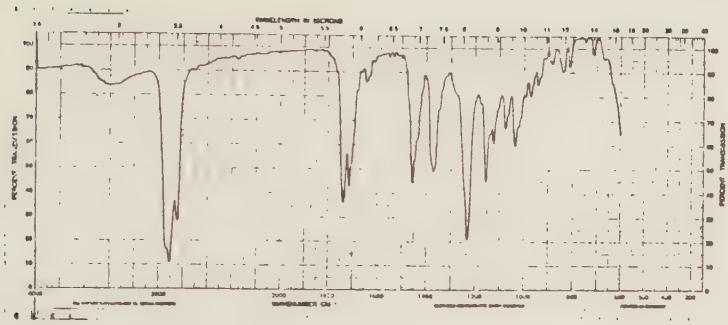


Abb. 46: IR-Spektrum des Naturstoffs S_1
KBr-Preßling, Beckman -Photometer IR-20 AX

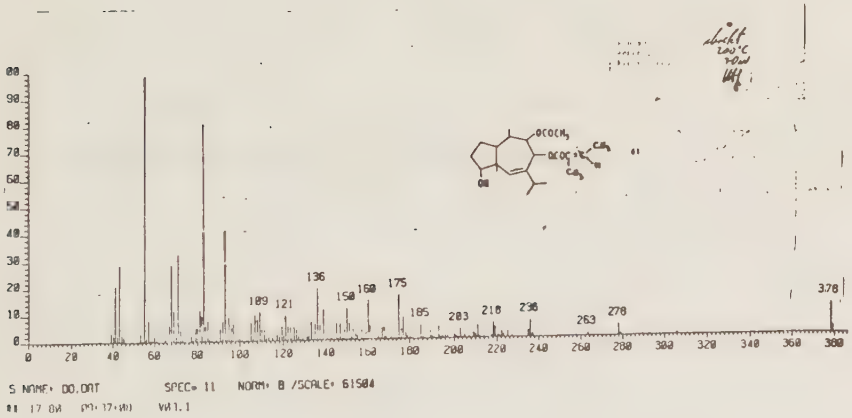


Abb. 47: MS des Naturstoffs S_1
Massenspektrometer der Fa. AEI Typ MS 9
Ionenqu.-Temperatur 200°C
Elektronen-Energie 70 eV

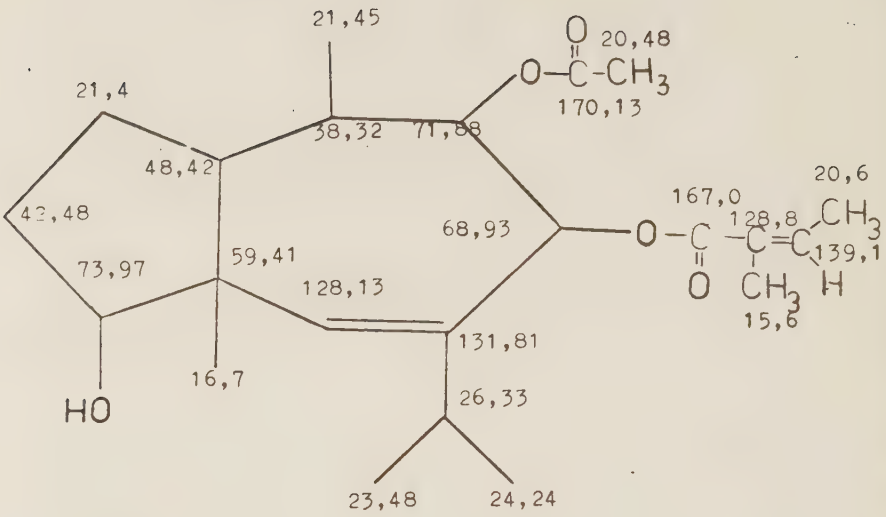
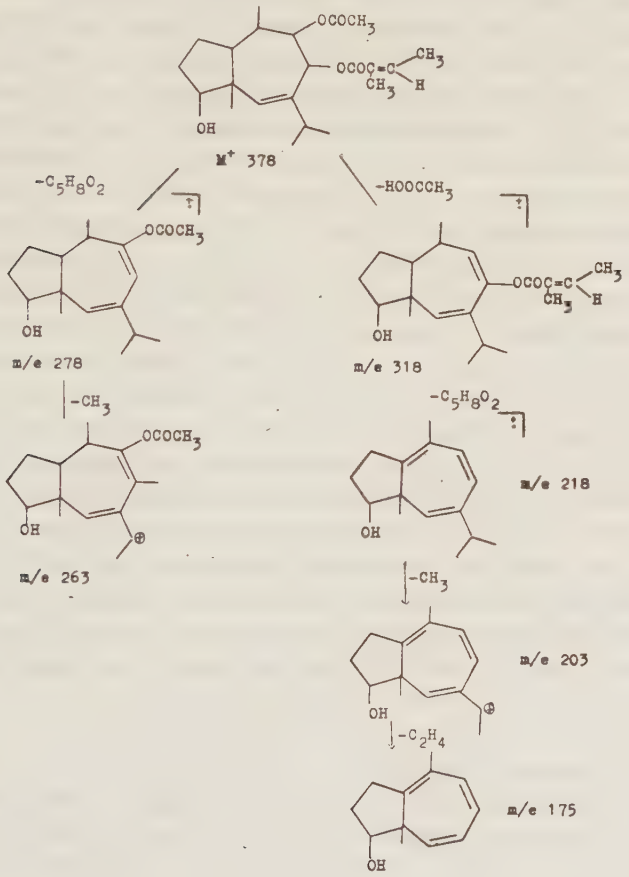


Abb. 48: ^{13}C-Signalzuordnung des Sesquiterpen-esters S_1

Schema 7:
Ein plausibler Zerfallsweg für den Naturstoff S_1.



XVI.

Isolierung und Strukturaufklärung von S_2

Zur Isolierung von S_2 wurde gemahlenes Galbanum-Harz mit n-Hexan(Soxhlet) extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vacuum wurde 1 gr. der gelblichen, öligen Fraktion in wenigen Dichlormethan aufgenommen und auf Kieselgel 60, feiner als 230 mesh, aufgesaugt. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vacuum bei 30° C wurde das imprägnierte Kieselgel auf die vorbereitete Säule (stationäre Phase: Kieselgel 60, feiner als 230 mesh; mobile Phase: n-Hexan/Ethylacetat (80 + 20) gebracht. Die Trennung wurde mittels DC, HPLC und UV-Licht bei 365 nm beobachtet. Die Fraktionen, welche die Verbindung S_2 enthielten, wurden vereinigt und im Vacuum bei 30° C eingeengt. Die gewonnene hellgelbliche, hochviskose Substanz wurde in wenig Chloroform aufgenommen und auf eine PSC-Fertigplatte (Kieselgel 60 F_{254} Schichtdicke 2 mm) aufgetragen. Nach der Entwicklung des Chromatogramms (mobile Phase n-Hexan/Ethylacetat 70 + 30) wurde die Zone der sehr schwach bei 254 und 365 nm absorbierenden Substanz S_2 markiert und auf die übliche Weise mit Dichlormethan eluiert, abfiltriert, eingeengt und aus Dichlormethan/Petrolether (1 + 2) kristallisiert. Nach mehreren Rekristallisationen wurde die Substanz S_2, DC und HPLC rein, gewonnen.

Die isolierten Kristalle der Verbindung S_2 schmelzen bei 88° C und zeigen einen Molekularpeak bei M^+ 366. Nach der Elementaranalyse handelt es sich um $C_{21}H_{34}O_5$; $MG_{ber.}$ 366,466; $C_{ber.}$ 68,82 %; $H_{ber.}$ 9,34 %; $C_{gef.}$ 68,68 %; $H_{gef.}$ 9,21 %.

Das IR-Spektrum der Verbindung S_2 (Abb. 49) zeigt eine Absorptionsbande bei 1740 cm^{-1}, die für eine Esterfunktion spricht. Das Signal bei 1235 cm^{-1} und die Absorptionsbande bei 1740 cm^{-1} sind der Carbonylgruppe der Essigsäure zuzu-

ordnen. Eine zweite Carbonylgruppe läßt sich bei etwa 1745 cm^{-1} kaum erkennen, da sie von der Absorptionsbande der Acethylgruppe überlagert wird. Diese Carbonylgruppe ist einer Esterfunktion zuzuordnen. Das Fehlen einer Absorptionsbande zwischen 1690 - 1695 cm^{-1} zeigt daß kein γ'Hydroxy-α,ß-ungesättigtes Butenolid vorhanden ist[6]. Die Carbonylfunktion eines Laktonringes erscheint üblicherweise zwischen 1765 und 1785 cm^{-1}. In diesem Bereich treten keine Absorptionsbanden bei S_2 auf. Das Signal bei 1620 cm^{-1} kann der Doppelbindung des Cyclopentenringes zugeordnet werden, was in Zusammenhang mit dem Signal bei 845 cm^{-1} für eine C=CH-Gruppe spricht. Das Auftreten von Valenzschwingungen bei etwa 3450 cm^{-1} ist einer freien Hydroxylgruppe zuzuordnen.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum der isolierten Verbindung S_2 (Abb. 50) zeigt die chemischen Verschiebungen und das Aufspaltungsmuster eines von Bohlmann und Mitarb. beschriebenen Carbinols[7]. Die chemischen Verschiebungen bei δ -0.91 ppm sind die Signale der nicht äquivalenten Methylgruppen der Isobuttersäure, deren α-ständiges Proton bei 2,48 ppm lokalisiert ist. Diese chemischen Verschiebungen und Aufspaltungsbilder entsprechen denen des in der Literatur beschriebenen Arnicolids C[5]. Die Signale der Protonen der Methylgruppen in der C - 5 und C - 10 - Stellung treten bei 1,07 und 1,15 ppm auf. Die Stellung des olefinischen Protons ist aus den chemischen Verschiebungen δ = 5,35 ppm und zum anderen aus den beobachteten Verschiebungen den Guajen-Derivate[8] und der Verbindung S_4 zu lokalisieren. Die Signale bei δ - 5,35 (6-H) und 5,16 ppm (8-H) haben die gleiche Intensität und das gleiche Aufspaltungsmuster, wie bei der Verbindung S_4 zu sehen ist. Dies ist ein Hinweis auf eine ähnliche Struktur. Neu sind die Verschiebungen bei δ - 4,97 ppm, die dem 9-H-Proton zuzuordnen sind. Das Proton der Iso-

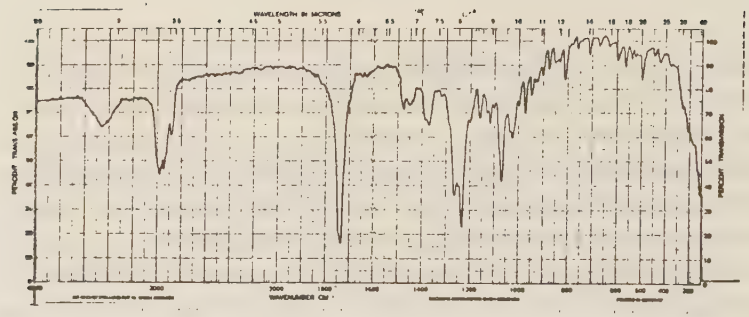


Abb. 49: IR-Spektrum des Naturstoffs S_2
KBr-Preßling, Beckman -Photometer IR-20 Ax

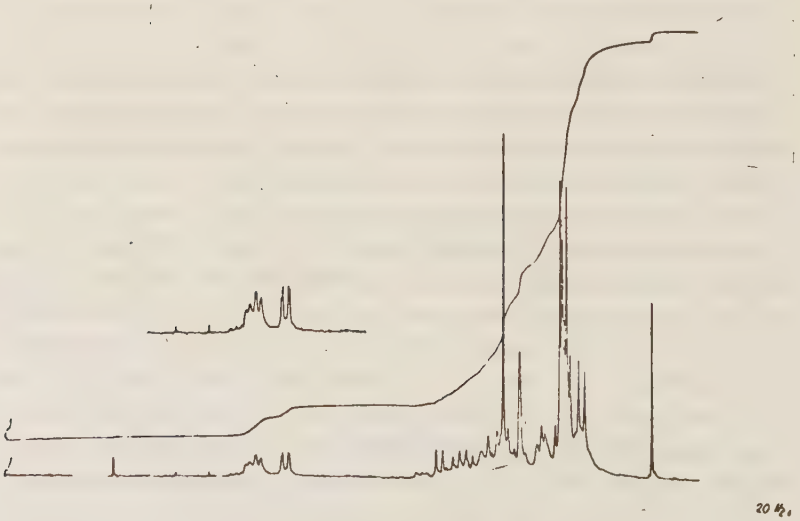


Abb. 50: 60 MHz-NMR-Spektrum des Naturstoffs S_2
in $CDCl_3$: Varian-A-60-NMR-Spektrometer

propylgruppe erscheint bei 2,30 ppm. Das Singulett bei δ -2,30 ppm ist nur mit einer allylischen Stellung der Isopropylgruppe vereinbar[9]. Dies folgt aus dem Ergebnis der Einstrahlung auf das Signal für 12 - H und 13 - H, welche das Signal 11 - H lokalisieren läßt.

Vergleiche mit ^{1}H-NMR-Messungen von Isoguajen, 11-Hydroxyguajen[9] und Substanz S_2 sprechen für die angenommene Guajen-Teilstruktur.

Nach der Summenformel enthält die Verbindung S_2 fünf Doppelbindungsäquivalente. Von diesen gehören zwei zu den Carbonylgruppen der Essig- und Isobuttersäure (170,0 und 176,0 ppm) (Abb. 51). Die olefinische Doppelbindung (128,7 und 131,2 ppm) ist zwischen C - 6 und C - 7 einzuordnen. An C - 7 muß laut ^{1}H-NMR-Messungen die Isopropylgruppe zugeordnet werden, die eine allylische Stellung verlangt. Die verbleibenden drei Doppelbindungsäquivalente sprechen für eine Cyclopentan-Cycloheptenring-Teilstruktur (Guajen-Struktur). Die geringe Polarisierung der C = C - Doppelbindung (131,0 und 128,9 ppm) und das Fehlen eines Konjugationseffekts auf die Carboxyl-Kohlenstoffatome (176,0 und 170,0 ppm) sprechen für einem gesättigten Ester. Aus der off-resonance-Multiplizität sowie den gegebenen Verschiebungen Cyclohepten-Cyclopentan gelingt die in Abb. 53 dargestellte Zuordnung.
Das Massenspektrum des Sesquiterpens S_2 (Abb. 52) zeigt den Molekularpeak bei M^+ 366. Durch Eliminierung eines Moleküls Essigsäure bildet sich ein metastabiles Ion bei m/e 306. Das Fragment bei m/e 278 entsteht durch Abspaltung von Isobuttersäure. Ein Vergleich mit MS-Fragmentierungen von 11,13 Dihydrohelenalin-Isobuttersäureester[5] bestätigt die Annahme, daß nach der Abspaltung der Essig- oder Isobuttersäure sich das gebildete Molekülion durch Abspaltung eines Protons stabilisiert.

Charakteristisch ist das Spaltprodukt m/e 71 das von der abgespaltenen Isobutylgruppe gebildet wird und in Verbindung mit der Masse m/e 43 $(CH_3)_2CH$ zu bringen ist, was für das Vorliegen einer gesättigten C_4 - Säure spricht.

Die Fragmentierung wurde in Tabelle 12 zusammengestellt:

Tabelle 12

m/e	Interpretation	%
366	M^+	
306	$M - CH_3COO^-;-H$	
278	$M - (CH_3)_2CHCOO^-;-H$	
263	$M - (CH_3)_2CHCOO^-;-H:-CH_3$	
236		
218	$M - CH_3COOH;-(CH_3)_2CHCOOH$	
203	$M - CH_3COOH;-(CH_3)_2CHCOOH;-CH_3$	
175	$M - CH_3COOH;-(CH_3)_2CHCOOH;-CH_3;-C_2H_4$	

Ein plausibler Zerfallsweg für den Naturstoff S_2 wurde in Schema 8 zusammengestellt.

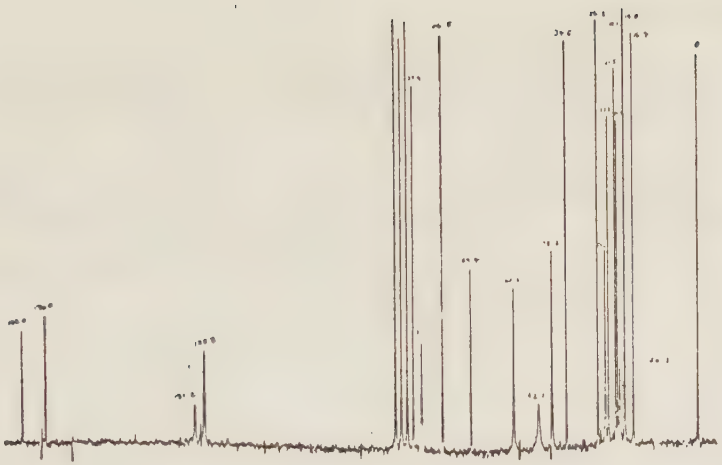


Abb. 51: ^{13}C-NMR-Spektrum des Naturstoffs S_2 in $CDCl_3$;
Brucker WP-80-Fournier-HMR-Spektrometer;
20 115 MHz für ^{13}C; 8000 MHz für ^{1}H-Entkopplung.

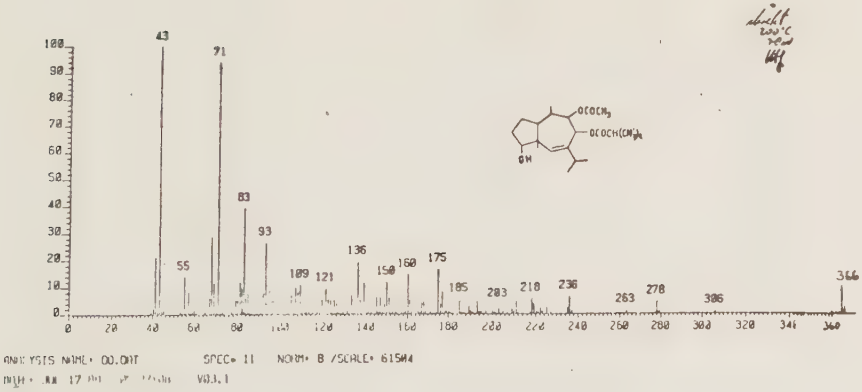


Abb. 52: MS des Naturstoffs S_2
Massenspektrometer der Fa. AEI Typ MS 9
Ionenqu.-Temperatur 200°C
Elektronen-Energie 70 eV

Tabelle 11

Die chemischen Verschiebungen des ^{13}C-NMR-Spektrums von Sesquiterpen S_2

Zuordnung	S_2/ppm ($CDCl_3$)	Art der Gruppe
C_1	48,2	CH
C_2	21,5	CH_2
C_3	42,1	CH_2
C_4	73,9	CHO
C_5	59,4	C
C_6	128,7	C=
C_7	131,2	CH=
C_8	66,5	CHO
C_9	71,7	CHO
C_{10}	38,2	CH
C_{11}	26,2	CH
C_{12}	23,3	CH_3
C_{13}	24,2	CH_3
C_{14}	20,9	CH_3
C_{15}	16,07	CH_3
C_{16}	176,0	C=O
C_{17}	34,5	CH
C_{18}	19,01	CH_3
C_{19}	19,0	CH_3
C_{20}	170,0	C=O
C_{21}	20,03	CH_3

x) Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Breitmaier für die freundliche Aufnahme und Interpretation dieser Spektren.

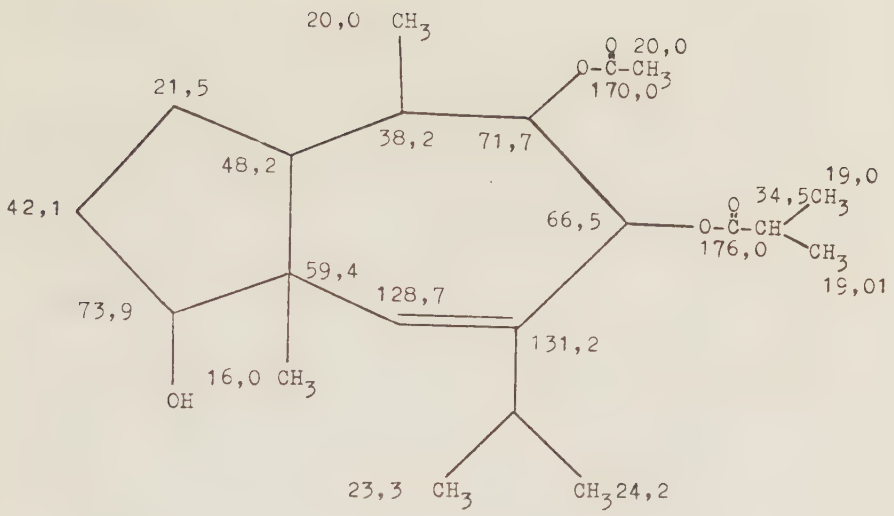
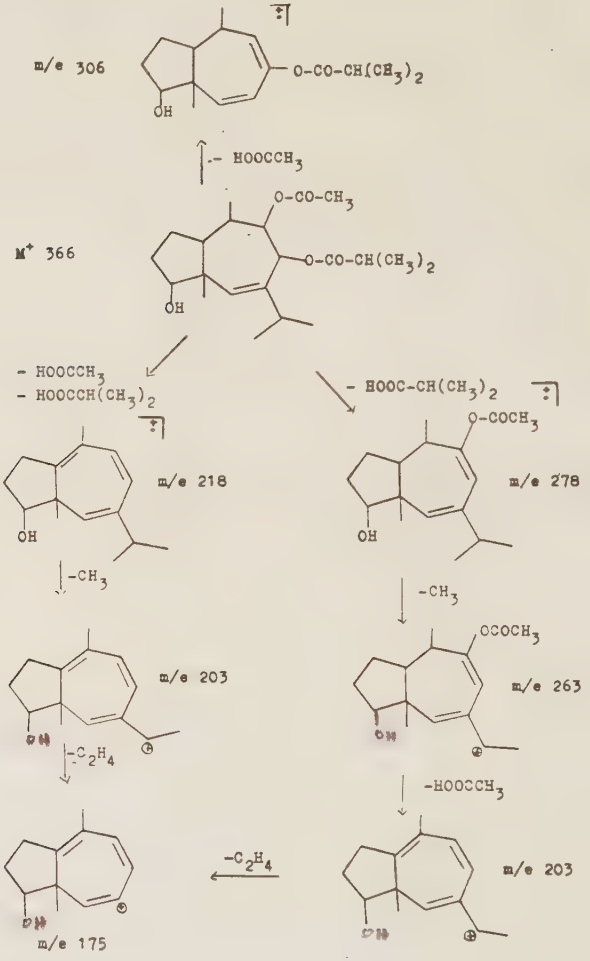


Abb. 53: ^{13}C-Signalzuordnung des Sesquiterpenesters S_2

Schema 8:
Ein plausibler Zerfallsweg für den Naturstoff S_2.



XVIII.1

Isolierung und Strukturaufklärung von S_3

Die Verbindung S_3 wurde mittels Säulen- und präparativer-Schichtchromatographie gewonnen, ähnlich wie die Substanz S_2 (S. 120). Die Verbindung zeigt einem Molekularpeak M^+ bei 278. Nach der Elementaranalyse handelt es sich um $C_{17}H_{26}O_3$; $MG_{ber.}$ 278,367; $C_{ber.}$ 73,35 %; $H_{ber.}$ 9,40 %; $C_{gef.}$ 73,21 %; $H_{gef.}$ 9,24 %.

Das IR-Spektrum zeigt eine breite Absorptionsbande in der Carbonylregion (Abb. 54), die der Acetylgruppe zuzuordnen ist. Vorhanden sind auch eine Absorptionsbande bei 1645 cm^{-1}, die für eine Doppelbindung spricht, und eine Absorptionsbande bei 3450 cm^{-1}, die einer freien Hydroxylgruppe zuzuordnen ist. Das Massenspektrum von S_3 zeigt einer Molekularpeak bei M^+ 278 (Abb. 55). Das erste Folgefragment bei m/e 218 deutet auf die Abspaltung von Essigsäure. Das Fragment bei m/e 43 deutet auf Vorhandensein der Acetylgruppe. Der Peak bei m/e 175 (Basispeak) entsteht durch Abspaltung der Essigsäure und der Isopropylgruppe.

Diese Spaltprodukte wie auch den Vergleich mit den von uns isolierten Sesquiterpen-Estern S_2-S_4 und anderen in der Literatur beschriebenen Sesquiterpen-Estern mit Essigsäure[5] lassen schlußfolgern, daß sich bei dieser Verbindung um einen Essigsäuresesquiterpenester vom Guajan-Typ handelt. Auf Grund von Elementaranalyse, Massenspektrometrie und chemischem Verhalten wird diese Verbindung die Struktur laut Abb. 56 vorgeschlagen.

Die Fragmentierung wurde in Tabelle 13 zusammengestellt:

Tabelle 13

m/e	Interpretation	%
278	M^+	16
263	$M - CH_3$	1
260	$M - H_2O$	2
236	$M - C_3H_6$	2,5
219	$M - CH_3COO^-$	6
218	$M - CH_3COOH$	24
203	$M - CH_3COOH; -CH_3$	20
200	$M - CH_3COOH; -H_2O$	14
175	$M - CH_3COOH; -(CH_3)_2CH^+$	100
160	$M - CH_3COOH; -(CH_3)_2CH^+; -CH_3$	60
43	CH_3CO^-	49

Ein plausibler Zerfallsweg für den Naturstoff S_3 wurde in Schema 9 zusammengestellt.

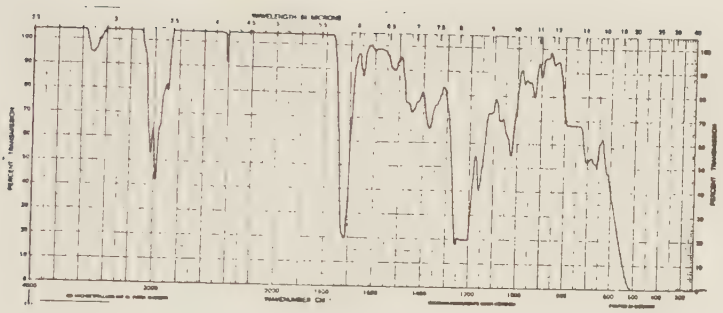


Abb. 54: IR-Spektrum des Naturstoffs S_3.
KBr-Preßling, Beckman -Photometer IR-20 AX

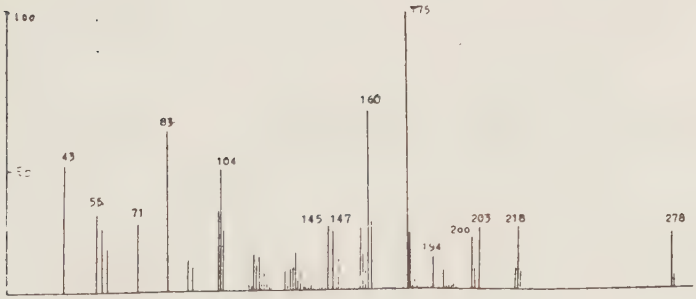


Abb. 55: MS des Naturstoffs S_3

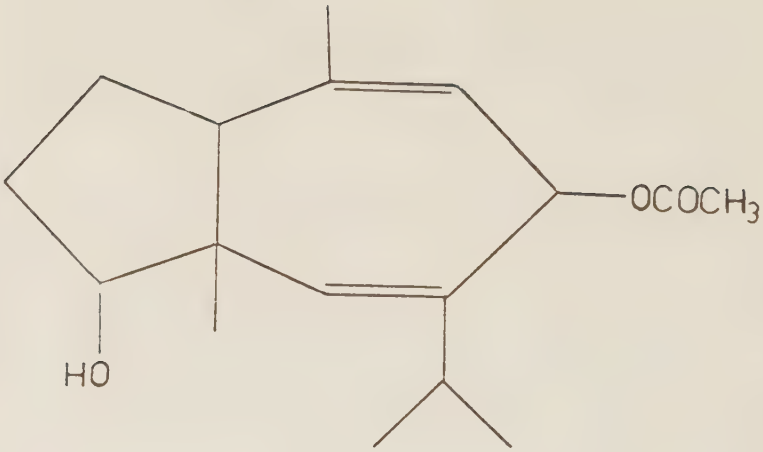
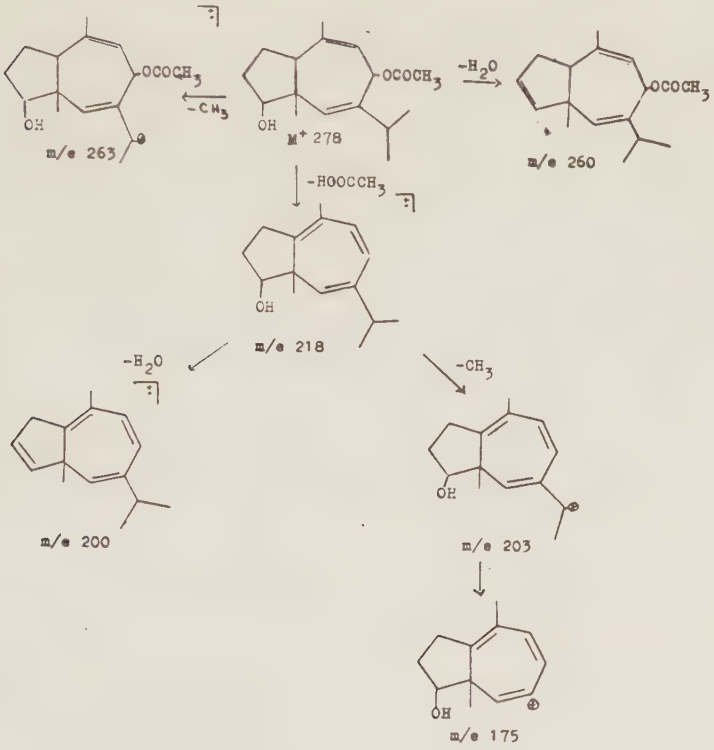


Abb. 56: S_3-$C_{17}H_{26}O_3$-Strukturvorschlag

Schema 9:

Ein plausibler Zerfallsweg für den Naturstoff S_3.



XVIII.

Isolierung und Strukturaufklärung des Sesquiterpenesters S_4

Zur Isolierung der Verbindung S_4 wurden 10 gr. gemahlenes Galbanum-Harz mit Diethylether (mittels Soxhlet) extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vacuum bei 30° C wurde der ölige Extrakt in 50 ml n-Hexan aufgenommen und 48 Stunden bei -18° C gekühlt. Der in n-Hexan ungelöste Teil wurde zweimal mit n-Heptan gewaschen, anschließend in wenigen Dichlormethan aufgenommen, auf Kieselgel, feiner als 230 mesh, aufgesaugt und im Vacuum bei 30° C getrocknet. Das imprägnierte Kieselgel wurde auf die vorbereitete Säule gebracht (stationäre Phase Kieselgel Si 60, feiner als 230 mesh; mobile Phase Chloroform/Methanol 98 + 2). Die Trennung wurde mittels DC, HPLC und UV-Licht von 365 nm beobachtet. Die Fraktionen, die die Verbindung S_4 enthielten, wurden vereinigt und im Vacuum bei 30° C eingeengt. Die isolierten weißen bis schwach gelblichen Kristalle (aus Diethylether/Chloroform 1 + 1) schmelzen bei 127° C und zeigen einen Molekularpeak bei M^+ 336. Nach der Elementaranalyse handelt es sich um $C_{20}H_{32}O_4$; $MG_{ber.}$ 336,441; $C_{ber.}$ 71,40 %; $H_{ber.}$ 9,57 %; $C_{gef.}$ 71,48 %; $H_{gef.}$ 9,48 %.

Das IR-Spektrum (Abb. 57) der Verbindung S_4 zeigt Absorptionsbanden bei 1750 und 1245 cm^{-1}, welche für eine Esterfunktion sprechen. Die Absorptionsbande bei 1650 cm^{-1} wird von der Doppelbindung des Säureanteils hervorgerufen, die auch die Signale bei 1175 und 1265 cm^{-1} verursacht. Das Vorhandensein einer Absorptionsbande bei 1690 cm^{-1} spricht für einen ungesättigten Säureanteil. Die Doppelbindung, die im ^{1}H-NMR und ^{13}C-NMR-Spektren erscheint, wird von der Absorptionsbande der Doppelbindung des Säureanteils überlagert und ist somit kaum erkennbar. Die scharfe Absorptionsbande bei 3450 cm^{-1} spricht für eine freie Hydroxylgruppe. Weitere Valenzschwingungen treten bei 1380, 1350, 1335, 1250, 1155, 1045, 1000, 920 und 845 cm^{-1} auf, die auch

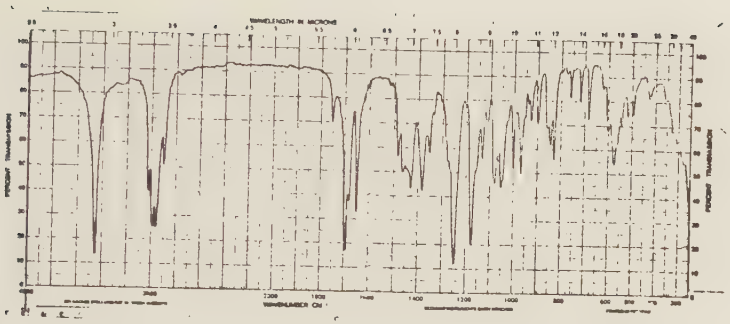


Abb. 57: IR-Spektrum des Naturstoffs S_4
KBr-Preßling, Beckman -Photometer IR-20 AX

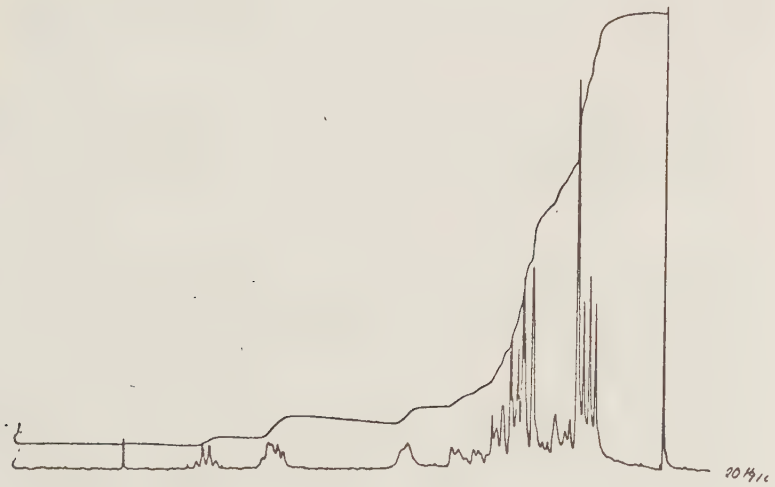


Abb. 58: 60 MHz-NMR-Spektrum des Naturstoffs S_4
in $CDCl_3$: Varian-A-60-NMR-Spektrometer

im IR-Spektrum der Angelicasäure vorhanden sind. Das Auftreten eines Quartetts bei δ=6,20 ppm (Abb. 58) ist typisch für das Vinylproton der Angelicasäure[10]. Vergleiche von ^{1}H-NMR-Messungen bereits bekannter Sesquiterpenlactone wie Eupasessifolid A und B[11] oder 3 ß-Hydroxy-8-ß-tiglinoyloxy-costunolid[2] zeigen, daß das Vinylproton der Tiglinsäure im Bereich von 6,62 bis 6,83 ppm shiftet. Bei 8 α-Tiglinoyloxy-cumambranolid[2] erscheint das Signal des Vinylprotons bei δ=6,95 ppm. Daß es sich bei der Verbindung S_4 um Angelicasäure und nicht Tiglinsäure handelt, belegen auch die ^{1}H-NMR-Vergleich mit 1α-Angeloyoxy-6α-hydroxy-carot-2-en[1]. Das Vinylproton erscheint bei dem Sesquiterpen bei δ=6,21 ppm, bei der Verbindung S_4 bei δ=6,20 ppm. Wie aus diesen Vergleichen zu entnehmen ist, erscheint das Signal der Vinylprotonen von Angelica- und Tiglinsäure sehr deutlich verschieden (etwa 0,4 ppm). Damit ist bewiesen, daß die Verbindung S_4 mit Angelicasäure und nicht mit Tiglinsäure einen Ester bildet. Die Methylgruppen der Angelicasäure erscheinen im ^{1}H-NMR-Spektrum bei 1,94 und 2,04 ppm. Diese Verschiebungen der beiden Methylgruppen schließen ebenfalls das Vorliegen der Tiglinsäure aus. Die Differenz der chemischen Verschiebungen der Methylsignale zueinander beträgt 0,10 ppm. Bei Tiglinsäure sind diese Verschiebungen zwischen 0,01 und 0,03 ppm vorhanden. Die Signale für die trans-ständigen CH_3-Gruppen der Angelicasäure sind um etwa 0,2 bis 0,3 ppm nach tiefem Feld verschoben. Die Stellung des olefinischen Protons ist aus den chemischen Verschiebungen δ=5,35 ppm und den beobachteten Verschiebungen von Guajen-Derivaten wie Guaja-4,6-dien,4α-Hydroxy-guaja-6(7)10(14)-dien[5], Isoguajen, 11-Hydroxyguajen[6] und der Verbindung S_2 ersichtlich :

Zuordnung an C - 6. Das Proton der Isopropylgruppe erscheint bei 2,30 ppm, was nur mit einer allylischen Stellung des

olefinischen Protons vereinbar ist[9]. Die Signale bei 0,99 und 1,07 ppm sind den Methylgruppen des Isopropyls zuzuordnen. Die weiteren zwei Methylgruppen an C - 4 und C - 10 erscheinen bei 0,91 bzw. 1,17 ppm. Bei 5,16 ppm erscheinen die chemischen Verschiebungen des Protons 9 H und bei 3,46 ppm des Protons 8 H.

Nach der Summenformel enthält die Verbindung S_4 fünf Doppelbindungsäquivalente. Von diesen zwei gehören zu der Angelicasäureeinheit (eine Carbonyl- und eine olefinische Doppelbindung). Die verbleibenden drei Doppelbindungsäquivalente sprechen - wie bei der Substanz S_2 - für eine Cyclopentan/Cycloheptenring-Teilstruktur (Guajen-Struktur).

Die geringe Polarisierung der CH = C Doppelbindung (129,63 und 128,35 pp) (Abb. 59) ist wie bei der Verbindung S_2 dem Cycloheptenringanteil zuzuordnen - zwischen C-6 - C-7.

Damit ist auch die Stellung der Isopropylgruppe an C-7 festgelegt. Wie aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum ersichtlich ist, muß diese Gruppe in einer allylischen Stellung sein.

Die vorhandene Polarisierung der C=C Doppelbindung (139,8 und 126,8 ppm) des 2-Methyl-2-butensäurerestes und das Vorhandensein eines Konjugationseffektes auf die Carboxyl-Kohlenstoffatome (168,06 ppm) sprechen für einen α, ß-ungesättigten Ester. Aus der off-Resonance-Multiplizität sowie mit Hilfe der gegebenen Verschiebungen des Sesquiterpen S_4 und durch Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Verbindungen 8α-Tiglinoyloxycumambranolid[2], Linkiol[12], Eupasessifolid A und B[11] und 1α-Angeloyloxy-6α-hydroxy-9-oxo-carot-2-ene[1] gelingt die in Abb. 61 dargestellte Zuordnung.

Das Massenspektrum der Substanz S_4 zeigt einen Molekularpeak bei M^+ 336 (Abb. 61). Das erste Folgefragment bei m/e 318 deutet auf die Abspaltung eines Moleküls Wasser hin. Das Fragment bei m/e 236 entsteht durch Abspaltung von Angelicasäure. Ein Vergleich mit 1α-Angeloyloxy-6α-hydroxy-9-oxo-carot-2-ene[1] bestätigt, daß bei unserer Verbindung das gleiche Fragmentierungsmuster vorliegt.

Charakteristisch ist das Spaltprodukt m/e 83, das von der abgespaltenen Angelicasäure gebildet wird und in Verbindung mit der Masse m/e 55 zu bringen ist, was für das Vorliegen einer ungesättigten C_5-Säure spricht. Die Abspaltung der Angelicasäure wird gefolgt von der Eliminierung eines Moleküls Wasser und der Abspaltung einer Methylgruppe. Der weitere Zerfall führt zu dem Peak m/e 175, charakteristisch für die Reihe dieser Sesquiterpenester S_1-S_4 aus Galbanum-Harz.

Es ist bekannt, daß durch Erhitzen von Angelicasäure Tiglinsäure entsteht. Ähnlich entsteht bei der Verbindung S_4 durch Erhitzen auf 260° C Tiglinsäure.

Die Fragementierung wurde in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 14

m/e	Interpretation	%
336	M^+	
318	$M - H_2O$	
236	$M - CH_3CH{=}CCH_3COOH$	
218	$M - C_5H_8O_2; -H_2O$	
203	$M - C_5H_8O_2; -H_2O; -CH_3$	
175	$M - C_5H_8O_2; -H_2O; -CH_3; -C_2H_4$	

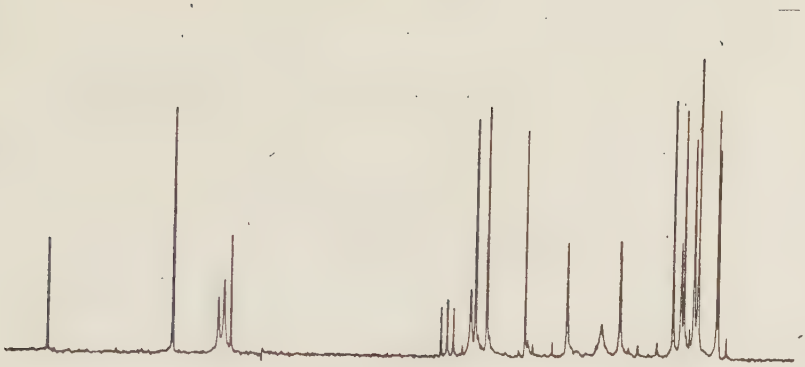


Abb. 59: ^{13}C-NMR-Spektrum des Naturstoffs S_4 in $CDCl_3$;

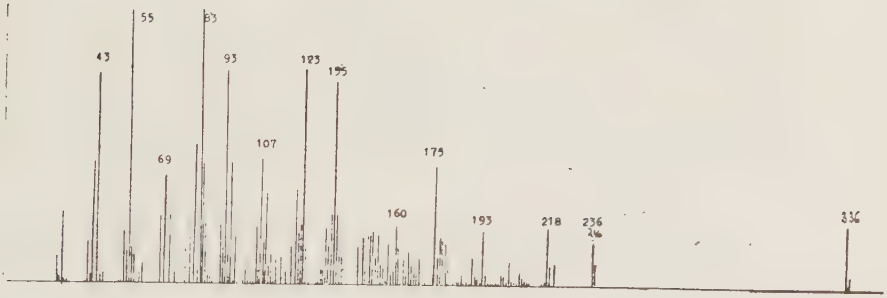


Abb. 60: MS des Naturstoffs S_4

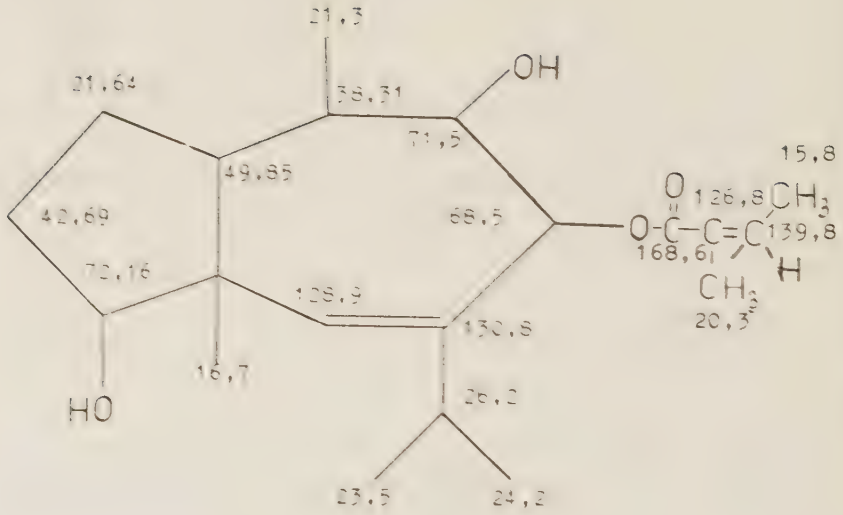
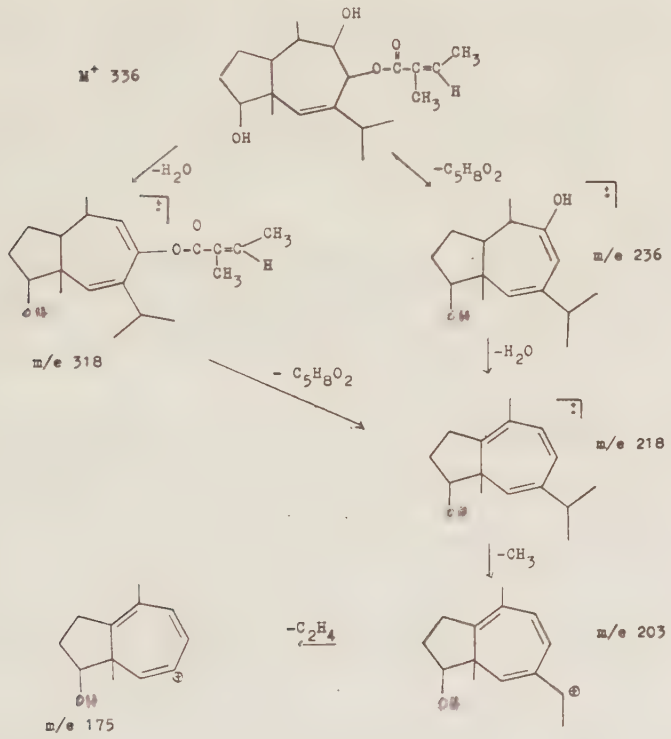


Abb. 61: ^{13}C-Signalzuordnung des Sesquiterpen-esthers S_4

Schema 10:
Ein plausibler Zerfallsweg für den Naturstoff S_4.



XVIII.2
Literatur

1. Mahmud, Z. F., Salam, N. A. A., Sarg, T. M. und Bohlmann, F., Phytochemistry 20, 735 (1981)
2. Bohlmann, F., Zdero, C., King, R. M. und Robinson, H., Phytochemistry 19, 2669 (1980)
3. Yoshiyasu Fukuyama, Tsuneo Sato, Yoshinori Asakawa und Tsunematsu Takemoto, Phytochemistry 21, 2895 (1982)
4. Bohlmann, F. und Ziesche, J., Phytochemistry 20, 469 (1981)
5. Röttger, P.-M., Dissertation, Düsseldorf (1981)
6. De Bernardi, M., Fronza, G., Mellerio, G., Vidari, G. und Vita-Finzi, P., Phytochemistry, 18, 293 (1979)
7. Bohlmann, F., Gupta, R. K., King, R. M. und Robinson, H., Phytochemistry 20, 331 (1981)
8. Bohlmann, F. and Knoll, K.-H., Phytochemistry 18, 995 (1979)
9. Bohlmann, F., Zdero, C. und Lonitz, M., Phytochemistry 16, 575 (1977)
10. Romo de Vivar, A., Guerrero, C., Diaz, E., Bratoeff, E. A. und Jimenes, L., Phytochemistry 15, 525 (1976)
11. Bohlmann, F., Dutta, L. N., Robinson, H. und King, R. M., Phytochemistry 18, 1401 (1979)
12. Gonzalez, A. G., Fraga, B. M., Hernandez, M. G., Luis, J. G., Estevez, R., Baez, J. L. und Rivero, M., Phytochemistry 16, 265 (1977)

XIX.

Zusammenfassung

Aus Galbanum-Harz wurden elf Verbindungen isoliert und ihre Struktur aufgeklärt. Aufgrund der Elementaranalysen, IR, UV, MS, ^{1}H-NMR und ^{13}C-NMR-Messungen handelt es sich bei neun Bestandteilen um bisher in der Literatur nicht beschriebene natürliche Verbindungen. Fünf Substanzen wurden als Sesquiterpen-umbelliferonether identifiziert, weitere vier Verbindungen als Ester eines und desselben Sesquiterpens vom Guajan-Typ. Alle genannten Sesquiterpen-umbelliferonether spalten bei Säurehydrolyse oder Erhitzen Umbelliferon ab. Es wurde nachgewiesen, daß Umbelliferon ein genuiner Bestandteil des Galbanum-Harzes ist.

Als Azulenogene wurden zwei Substanzen S_2 und S_4 isoliert, die bei Behandlung mit einer geringen Menge Schwefel Guajazulen liefern. Die Isolierung von S_2 und S_4 stützt die Vermutung, daß die Pseudoguajan-Derivate aus Guajan-Derivaten gebildet werden und nicht aus den Germacren-Vorstufen.

Die aus dem Destillat des Galbanum-Harzes isolierte Tiglinsäure ist nicht genuin, sondern bildet sich aus Angelicasäureestern (z. B. aus S_2).

Es wurden zwei DC-Systeme zur Trennung und Identifizierung der Sesquiterpen-umbelliferonether entwickelt. Ein neues DC-System ermöglicht den Nachweis derjenigen Bestandteile des Galbanum-Harzes, die im UV-Bereich keine Absorption zeigen.

Ein qualitatives und ein quantitatives analytisches HPLC-System für die Hauptbestandteile des Galbanum-Harzes wurden entwickelt. Damit ist es zugleich möglich, den Einfluß von Temperaturen, Säuren oder anderen Faktoren auf die ursprünglichen Komponenten nachzuweisen. Eine DC-HPLC-Kopplung zur Überprüfung der Reinheit aller gewonnenen Galbanum-Komponenten wurde entwickelt.

Lebenslauf

Am 13.06.44 wurde ich, Mihai Alexa als Sohn des Mihai V. Alexa und seiner Ehefrau Maria geb. Ionescu in Merisani-Arges/Rumänien geboren.

Von 1951 - 1958 besuchte ich die Volksschule, anschließend das Gymnasium in Birlad/Rumänien, wo ich 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Das Chemiestudium (Fachrichtung Organische Chemie) begann ich Oktober 1963 an der Universität "Alexander Ioan Cuza" in Jassy/Rumänien und beendete es dort mit dem Staatsexamen in Chemie Juli 1969.

Bis Juni 1974 arbeitete ich in der Antibiotika-Fabrik Jassy.

Im März 1972 bestand ich die Aufnahmeprüfung als Doktorand und bis Mai 1974 habe ich alle vorgesehenen Prüfungen abgelegt. Seit Juli 1974 lebe ich in der Bundesrepublik Deutschland. Im Mai 1976 begann ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Graf mit der Dissertation über Inhaltsstoffe von Galbanum-Harz. Mit Unterbrechungen aus wirtschaftlichen Gründen (August 1976/Januar 1977; Juni 1978/Januar 1980; Mai 1980/Januar 1981) wurde die praktische Arbeit Ende 1980 abgeschlossen.

Von Februar 1981 bis Juni 1982 war ich wissenschaftlicher Angestellter des Univ.-Klinikums Tübingen.

Seit Juli 1982 arbeite ich in der Pharmazeutischen Industrie.

Im Dezember 1978 habe ich geheiratet und am 14.06.1982 wurde unser Sohn Edmond-Tiberius geboren.

Meine akademischen Lehrer waren außer Prof. H. Auterhoff und E. Graf in Tübingen die Professoren:

R. Ralea	Anorganische Chemie
M. Poni	Anorganische Chemie
I. Zugravescu	Organische Chemie und Stereochemie
M. Petrovanu	Organische Chemie und Stereochemie
I. A. Schneider	Physikalische Chemie
V. Ababei	Technologie
V. Arventiev	Analytische Chemie
I. Tutovanu	Physik

Privat-Dozenten:

E. Carp	Spezielle Synthesen
E. Rucinski	Synthese v. Medikamenten
S. Fisel	Analytische Chemie
Fl. Cimpan	Mathematik
I. Gotlieb	Theoretische Physik
I. Idriceanu	Kristallographie

Lektoren:

M. Caprosu
I. Sirgie
A. Bold
E. Nicolaescu
N. Nicolaescu

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353